

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO DOS
RESÍDUOS DE PROCESSAMENTO DE CIOBA (*Lutjanus analis*),
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E CORVINA (*Micropogonias
furnieri*)**

ROBSON COELHO DE ARAUJO NERI

RECIFE
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

ROBSON COELHO DE ARAUJO NERI

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

RECIFE
2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Neri, Robson Coelho de Araújo

Extração e caracterização do colágeno obtido dos resíduos de processamento de cioba (*Lutjanus analis*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e corvina (*Micropogonias furnieri*) / Robson Coelho de Araújo Neri. – 2017.

133 f. : il.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior.

Coorientador: Ranilson de Souza Bezerra.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2017.

Inclui referências anexos.

1. Colágeno 2. Produtos pesqueiros I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientadora) II. Bezerra, Ranilson de Souza III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 075

ROBSON COELHO DE ARAUJO NERI

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO DOS
RESÍDUOS DE PROCESSAMENTO DE CIOBA (*Lutjanus analis*),
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E CORVINA (*Micropogonias
furnieri*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 31/03/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior UFPE

Prof^a. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira UFPE

Prof. Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior UFPB

Dr. Thiago Barbosa Cahú UFPE

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra UFPE

“Tenho esperanças de que um maior e mais profundo conhecimento do mar, de que há milênios os homens recebem sabedoria, inspire mais uma vez os pensamentos e as ações que preservarão o equilíbrio da Natureza e permitirão a conservação da própria vida.”

Jacques Cousteau

Dedico este trabalho aos meus pais e família por sempre mostrarem que na vida portas e janelas sempre estarão abertas para aqueles que ousam sonhar.

AGRADECIMENTOS

Talvez esse seja o ponto mais injusto de um trabalho de conclusão de curso, pois algumas páginas são de um espaço insuficiente para lembrarmos daqueles a quem podemos ser gratos por algo na vida, essa escola que através de suas lições nos mostra que é impossível chegar a algum lugar sozinho.

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, por terem me possibilitado chegar até aqui, reconheço que sem eles percorrer esse caminho talvez não fosse possível, porque mesmo estando próximos ou distantes sempre participaram das pequenas e grandes conquistas dessa vida.

Ao meu irmão pela amizade e apoio durante todos esses anos e também a minha irmã que apesar da distância e dos poucos momentos juntos sempre demonstrou grande carinho e afeto por mim. E por fim dedico este espaço também a tios avós e primos que contribuíram com suas vidas para que este sonho se tornasse realidade.

A Olávio Campos e Werlayne Mendes por essa convivência e apoio durante os momentos fora do trabalho.

Aos amigos adquiridos durante a graduação, Karollina Lopes, Andréia Fonseca, Clarissa França, Rogério Portela, Kátia Fernanda, Nathália Leite, Tiago Levi, Thiago Xavier, Nelson Lima, Marcelo Oliva, Luana Oliveira, Rodrigo César, Iris Melo, Igor Oliveira, Igor Moraes, Janaina Uchôa, Hercília Santos, Amanda de Lima, Elizabeth, Morgana Xavier, Professor Emanuel Pontual, Aline de Paula, e a todos que deixaram alguma contribuição durante esse momento impar.

Dedico também aos amigos trindadenses Luiz Eric Borges, Fernando Henrique, Julia Ramos, Jordânia Ramos, Juliana Ramos, Lindinaldo Lima, Claudécio Bezerra, Claudiano Bezerra, Valtenci Assunção, João Amâncio Borges, Carlos Émerson, Drummond Stenio, John Vieira, Franklin Vieira, Evanilson Alves, Álvaro Mendes, Lucian Mendes, Alexandre Mendes, Marcos Fábio, Leonarth Piancó, Valtermaria Vieira, Josevânio Oliveira, Professora Emannuele, Agmar, Antonio, Lourdes Borges, Renildo Lourenço, Ismael Alves, Professora Zildete Milfont, Janilson Barros, Francisca Ato, por todos esses anos de fraterna amizade e companheirismo.

Aos amigos e professores araripinenses Paulo Fonseca Valdinar Lacerda, Paulo Albuquerque, Cristina Alencar, Lindalva Delmondes, Graça Lúcia, Pedro Junior, Álvaro Arraes, Jonathan Solidônio, Lívia Fernanda, Jonathan Oliveira, Darlan, Isadora Sá, Marcio Jaques, Jorge Possetti, Breno Oliveira, Johnathan Oliveira, e a muitos outros quem estiveram presentes em algum momento.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia (LABENZ) e Departamento de Bioquímica - Talita Espósito, Fábio Marcel, Thiago Cahú, Caio Assis, Renata França, Ian Porto, Marina Marcuschi, Professor Ricardo Abadie, Professora Juliana Santos, Lidiane Cristina, Amália Medeiros, Milena Marcia Raiana Apolinário, Maiara Celine, Mary Aranda, Andreia Cybelle, Professora Elba Maciel, Professora Juliett Xavier, Professora Márcia Vanusa, Professor Thiago Henrique, Robson Liberal (in memorian), Patrícia Fernandes (in memorian) , Kelma Souza, Kézia Moura, Luiz Paulo, Janilson Fêlix, Douglas Holanda, Paula Raiane, Flávia Thuane, Karina Ribeiro, Patrícia Fernandes, Cynarha Cardoso, Raquel Pereira, Diego Buarque, Djalma, Romero Marcos, Miron Oliveira, Professora Maria Betania e em especial ao Professor Augusto Cézar Vasconcelos de Freitas Junior e Helane Maria Silva da Costa por todas as lições e apoios dados durante esses dez anos de convivência profissional e fraterna.

Nesse espaço lembro também dos amigos Gustavo Araújo, Julio César Souza, Mirael Lima, Philipe Moreira, José Ailton, José Kledson, Ebenezer Bernardo, Eriksen Rafael e Ticiano Navarro pela convivência e apoio desde quando cheguei a esta cidade.

Ao casal de missionários Pastor Edmilson Siebra e Maria Gilvanete Barbosa pelo apoio e conselhos tão úteis durante essa caminhada.

A professora Laise de Holanda Cavalcanti Andrade pela oportunidade de trabalhar e aprender um pouco da experiência de sala de aula sou lhe grato por esta grande contribuição.

Agradeço também aos membros da banca examinadora por terem emprestado um pouco do seu tempo no intuito de contribuir com esse trabalho.

Ao professor Ranilson de Souza Bezerra, meu co-orientador, por ter me cedido espaço em seu laboratório, para que eu pudesse trilhar meus caminhos através da vida acadêmica.

Ao professor Luiz Bezerra de Carvalho Junior, meu orientador, por ter ajudado no cumprimento das atividades desse projeto e ter sido uma inspiração como pesquisador e pessoa.

Aos órgãos nacionais de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq, FACEPE e FINEP, pelo apoio financeiro prestado a esse projeto.

RESUMO

O colágeno é um biomaterial dotado de excelente biocompatibilidade e segurança em face de sua biodegradabilidade e fraca antigenicidade com grandes aplicações médicas. Os resíduos da indústria pesqueira são uma fonte promissora para a obtenção desta proteína. O presente trabalho teve como objetivo extrair e caracterizar parcialmente o colágeno obtido a partir das escamas de cioba (*Lutjanus analis*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pele de corvina (*Micropogonias furnieri*). O colágeno foi obtido por meio de extração ácida (CAS) e com o uso da pepsina (CPS). Os rendimentos observados para a extração de *L. analis*, *M. furnieri* e *C. macropomum* foram, respectivamente: CAS 3,85% e CPS 6,15%; CAS 22,46% e CPS 44,25%; CAS 1,59% e CPS 1,20%. Em SDS-PAGE as amostras de colágeno extraídas via CAS ou CPS apresentaram duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$, além de cadeias β e γ . Os colágenos CPS e CAS foram solúveis na faixa de pH 2 – 6 para todas as espécies. Ambos os colágenos foram solúveis na faixa de concentração de NaCl de 0-4% (p/v). O espectro de absorção de raios ultravioleta (UV) demonstrou a existência de um baixo conteúdo de aminoácidos cromóforos, indicando a ausência de contaminantes no material extraído. A temperatura máxima de transição (T_{max}) obtida para as amostras de CAS e CPS alcançou, respectivamente, 76°C e 77°C para a cioba. A análise do conteúdo de aminoácidos do colágeno de cioba revelou ser glicina o aminoácido predominante, seu conteúdo junto dos iminoácidos prolina e hidroxiprolina equivale a pouco mais de um terço do total de aminoácidos, característica comum ao colágeno. As análises SDS-PAGE, FTIR e absorção de raios UV permitem concluir que o colágeno extraído dos peixes em análise foi do tipo I. Os resultados obtidos neste trabalho indicam a possibilidade do uso dos resíduos de processamento destas espécies como fonte alternativa de colágeno.

Palavras-chave: Cioba (*Lutjanus analis*). Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Corvina (*Micropogonias furnieri*). Colágeno. Subprodutos Pesqueiros.

ABSTRACT

Collagen is a biomaterial endowed with excellent biocompatibility and safety due to its biodegradability and poor antigenicity with large medical applications. Waste from the fishing industry is a promising source for this protein. The present work had the objective of extracting and partially characterizing the collagen obtained from the scales of mutton snapper (*Lutjanus analis*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) and whitemouth croaker skin (*Micropogonias furnieri*). Collagen was obtained by acid extraction (ASC) and by the use of pepsin (PSC). The yields observed for *L. analis*, *M. furnieri* and *C. macropomum* were: ASC 3.85% and PSC 6.15%; ASC 22.46% and PSC 44.25%; ASC 1.59% and PSC 1.20%. In SDS-PAGE the collagen samples extracted via ASC or PSC showed two $\alpha 1$ chains and one $\alpha 2$ chain, in addition to β and γ chains. The PSC and ASC collagens were soluble in the range of pH 2 - 6 for all species. Both collagens were soluble in the 0-4% (w / v) NaCl concentration range. The absorption spectrum of ultraviolet (UV) rays demonstrated the existence of a low content of amino acid chromophores, indicating the absence of contaminants in the extracted material. The maximum transition temperature (Tmax) obtained for the ASC and PSC samples was, respectively, 76 ° C and 77 ° C for the mutton snapper. Analysis of the amino acid content of the collagen of mutton snapper revealed to be glycine the predominant amino acid, its content next to the iminoacids proline and hydroxyproline equals little more than a third of the total of amino acids, characteristic common to the collagen. SDS-PAGE, FTIR and UV absorption allow us to conclude that the collagen extracted from the fish under analysis was type I. The results obtained in this work indicate the possibility of using the processing residues of these species as an alternative source of collagen.

Key-words: Mutton Snapper (*Lutjanus analis*). Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*). Collagen. Fish by-Products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico demonstrando a produção aquícola brasileira por região.	20
Figura 2: Principais espécies cultivadas no país por região.	21
Figura 3: Exemplar adulto de Tambaqui (<i>C. macropomum</i>).	22
Figura 4: Exemplar de Cioba L. analis que apresenta as principais características relatadas na literatura.....	24
Figura 5: Exemplar adulto de corvina (<i>M. furnieri</i>) apresentando as principais características da espécie.....	26
Figura 6: Estrutura do colágeno: (a) forma de tríplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla; (d) modelo do quarto alternado pentafibrilar.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Evolução dos números da pesca e aquicultura ao longo dos últimos anos.....	17
Tabela 2: Principais produtores mundiais de espécies cultiváveis.....	18
Tabela 3: Tipos de colágeno, formas e distribuição nos tecidos	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC	Acid Soluble Collagen
CAS	Colágeno Ácido Solúvel
CPS	Colágeno Pesino Solúvel
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
FAO	Food and Agriculture Organization
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUCN	International Union for Conservation of Nature
MPA	Ministério da Pesca
PDA	Plano de Desenvolvimento da Aquicultura
PSC	Pepsin Soluble Collagen
SOFIA	The State of World Fisheries and Aquaculture

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 PESCA E AQUICULTURA	17
2.2 TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>).....	21
2.3 CIOBA (<i>Lutjanus analis</i>).....	23
2.4 CORVINA (<i>Micropogonias furnieri</i>)	25
2.5 RESÍDUOS DE PROCESSAMENTO DO PESCADO E POSSÍVEIS APLICAÇÕES	27
2.6 COLÁGENO	29
2.6.1 Fontes de Colágeno	35
3 OBJETIVO GERAL	37
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO A PARTIR DAS ESCAMAS DA CIOBA (<i>Lutjanus analis</i>)	38
5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO A PARTIR DAS ESCAMAS DO TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>)	64
6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO A PARTIR DA PELE DE CORVINA (<i>Micropogonias furnieri</i>)	84
7 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXO – NORMAS DA REVISTA FOOD HYDROCOLLOIDS	111

1 INTRODUÇÃO

Em todo o planeta a demanda por pescado apresentou um forte crescimento nas últimas décadas, impulsionando o desenvolvimento da aquicultura e a colocando no patamar das principais atividades ligadas ao agronegócio.

Os organismos aquáticos vêm se tornado cada vez mais presentes como alimentos no mundo inteiro e em paralelo ao aumento da sua presença novas formas de consumo têm se desenvolvido, privilegiando o processamento deste alimento visando uma maior facilidade e praticidade no seu consumo. Em consequência disso uma grande quantidade de material biológico como escamas, peles, ossos, vísceras, carapaças e barbatanas, que podem perfazer até 75% do peso do animal, acaba sendo descartada no meio ambiente. Grandes quantidades de matéria orgânica têm sido descartadas pelas atividades relacionadas à pesca. A descarga desses resíduos e o seu acúmulo geram problemas ambientais aos recursos hídricos e ao solo. Apesar de existirem mecanismos naturais capazes de decompor essa matéria orgânica, esta capacidade é exaurida devido às grandes quantidades descartadas. Torna-se fundamental o aproveitamento desses dejetos, tanto para a manutenção sustentável da atividade pesqueira quanto para agregar valor ao produto gerado.

Atividades relacionadas à gestão de resíduos apresentam elevada eficiência na redução de impactos ambientais gerados pelo descarte de matéria orgânica, mas questões logísticas contribuem para que ela seja onerosa para a indústria pesqueira. O reaproveitamento deste material como uma fonte de novos recursos se torna um investimento atrativo e solução mais plausível para a redução do descarte de material biológico.

O uso dessa matéria orgânica residual como uma nova fonte para a obtenção de importantes biomoléculas como o colágeno é um investimento atrativo, propondo alternativas mais viáveis e seguras para a obtenção desses recursos em comparação às fontes usuais.

Trabalhos científicos têm reportado a obtenção de colágeno a partir de resíduos da indústria pesqueira, assim como também a sua aplicabilidade em diversos segmentos

de biotecnologia, farmácia e biomedicina, devido a propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade, antigenicidade e plasticidade. Além dessas características, o uso de colágeno proveniente de fontes aquáticas diminui o temor quanto ao risco de transmissão de zoonoses, uma vez que organismos aquáticos são evolutivamente distantes dos mamíferos, e abre a porta para que produtos à base de colágeno cheguem a novos mercados, pois geralmente organismos aquáticos não se enquadram em restrições alimentares religiosas.

O Brasil está entre os principais produtores de pescado do mundo e suas espécies nativas têm tido uma participação crescente na cadeia produtiva, em razão disso os problemas relacionados a atividades pesqueiras fazem parte do cotidiano do produtor brasileiro. O estudo do reaproveitamento de resíduos gerados pela produção de peixes nativos e com significativa importância econômica se faz necessário. Resíduos como peles, escamas, ossos e bexiga natatória são ricos em colágeno, fato esse que converte esses dejetos em uma promissora fonte dessa biomolécula.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PESCA E AQUICULTURA

Para milhões de pessoas em todo o mundo a pesca e aquicultura são uma importante fonte de alimento, nutrição, renda e meio de subsistência. O abastecimento mundial *per capita* de peixes atingiu a marca de 20 kg em 2014, um novo recorde alcançado devido ao vigoroso crescimento da aquicultura, que agora fornece metade de todos os peixes para consumo humano, e a melhoria de unidades populacionais devido a avanços na gestão de pesca. Além disso, o peixe é um dos produtos alimentares mais comercializados no mundo, com mais da metade das exportações proveniente de países em desenvolvimento (FAO, 2016). Em 2014, segundo relatórios da FAO a produção mundial de pescados alcançou o montante de 167,2 milhões de toneladas, sendo 93,4 milhões obtidos a partir da captura e 73,8 milhões de atividades aquícolas (FAO, 2016) como pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1: Evolução dos números da pesca e aquicultura ao longo dos últimos anos.

PRODUÇÃO MUNDIAL DA PESCA E AQUICULTURA (milhões de toneladas)						
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
PRODUÇÃO						
Captura						
Continental	10,5	11,3	11,1	11,6	11,7	11,9
Marinha	79,7	77,9	82,6	79,7	81,0	81,5
Total de captura	90,2	89,1	93,7	91,3	92,7	93,4
Aquicultura						
Continental	34,3	36,9	38,6	42,0	44,8	47,1
Marinha	21,4	22,1	23,2	24,4	25,5	26,7
Total da aquicultura	55,7	59,0	61,8	66,5	70,3	73,8
TOTAL	145,9	148,1	155,5	157,8	162,9	167,2

Fonte: FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Adaptado.

Neste cenário, o Brasil vem aumentando sua produção e se posicionando entre os 25 maiores produtores da aquicultura mundial. Em 2014, o país foi o 14º maior produtor mundial de espécies cultiváveis (FAO, 2016), como podemos evidenciar na tabela 2. Com 8.500 km de costa marítima, a maior reserva de água doce do mundo; 8,2 bilhões de metros cúbicos de água distribuídos em rios, lagos, açudes e represas, além de condições climáticas e ambientais favoráveis, o país está em uma posição privilegiada para avançar nesse ranking e passar a ser um dos maiores produtores mundiais de pescado (MPA 2014, PDA, 2015).

Tabela 2: Principais produtores mundiais de espécies cultiváveis.

25 MAIORES PRODUTORES E PRINCIPAIS ESPÉCIES CULTIVÁVEIS EM 2014								
MAIORES PRODUTORES	AQUICULTURA CONTINENTAL (PEIXES)	AQUICULTURA MARINHA (PEIXES)	MOLUSCULOS	CRUSTÁCEOS	OUTROS ANIMAIS AQUÁTICOS	TOTAL DE ANIMAIS AQUÁTICOS	PLANTAS AQUÁTICAS	PRODUÇÃO TOTAL DA AQUICULTURA
CHINA	26029,7	1189,7	13418,7	3993,5	839,5	45469,0	13326,3	58795,3
INDONÉSIA	2857,6	782,3	44,4	613,9	0,1	4253,9	10077,0	14330,9
ÍNDIA	4391,1	90,0	14,2	385,7	...	4881,0	3,0	4884,0
VIETNÃ	2478,5	208,5	198,9	506,2	4,9	3397,1	14,3	3411,4
FILIPINAS	299,3	373,0	41,1	74,6	...	788,0	1549,6	2337,6
BANGLADESH	1733,1	93,7	...	130,2	...	1956,9	...	1956,9
REPÚBLICA DA CORÉIA	17,2	83,4	359,3	4,5	15,9	480,4	1087,0	1567,4
NORUEGA	0,1	1330,4	2,0	1332,5	...	1332,5
CHILE	68,7	899,4	246,4	1214,5	12,8	1227,4
EGITO	1129,9	7,2	...	1137,1	...	1137,1
JAPÃO	33,8	238,7	376,8	1,6	6,1	657,0	363,4	1020,4
MIAMAR	901,9	1,8	...	42,8	15,6	962,2	2,1	964,3
TAILÂNDIA	401,0	19,6	209,6	300,4	4,1	934,8	...	934,8
BRASIL	474,3	...	22,1	65,1	0,3	561,8	0,7	562,5
MALÁSIA	106,3	64,3	42,6	61,9	0,6	275,7	245,3	521,0
REPÚBLICA DEMOCRÁTICA POPULAR DA CORÉIA	3,8	0,1	60,2	...	0,1	64,2	444,3	508,5
ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA	178,3	21,2	160,5	65,9	...	425,9	...	425,9
EQUADOR	28,2	0,0	...	340,0	...	368,2	...	368,2

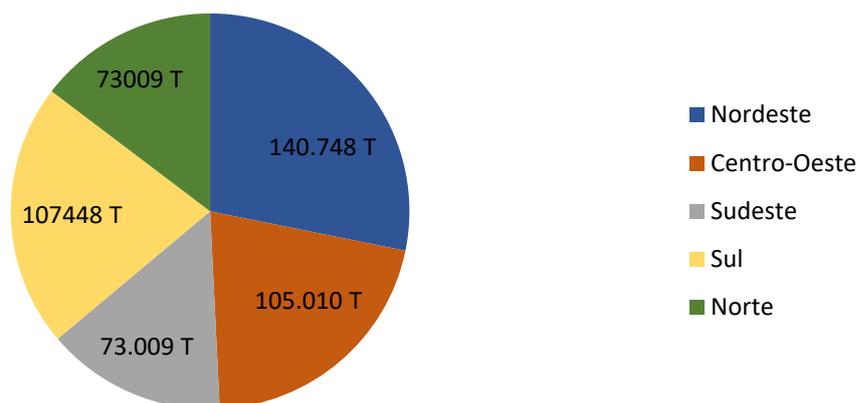
TAIWAN (PROVÍNCIA CHINESA)	117,3	97,8	99,0	21,9	3,6	339,6	1,0	340,6
IRÃ	297,5	0,1	...	22,5	...	320,2	...	320,2
NIGÉRIA	313,2	313,2	...	313,2
ESPANHA	15,5	44,0	222,5	0,2	0,0	282,2	0,0	282,2
TURQUIA	108,2	126,1	0,1	234,3	...	234,3
REINO UNIDO	13,5	167,3	23,8	204,6	...	204,6
FRANÇA	43,5	6,0	154,5	0,0	...	204,0	0,3	204,3
TOP 25 SUBTOTAL	42041,2	5837,5	15696,7	6638,3	890,9	71058,2	27127,2	98185,4
MUNDIAL	43559,3	6302,6	16113,2	6915,1	893,6	73783,7	27307,0	101090,7
PARTICIPAÇÃO % DOS TOP 25 NO TOTAL MUNDIAL	96,5	92,6	97,4	96,0	99,7	96,3	99,3	97,1

Fonte: FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Adaptado.

Segundo os últimos dados do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção brasileira de pescado foi de 1.241.807 toneladas em 2013, sendo 765.287 toneladas de origem extrativa (61,6%) e 476.512 toneladas provenientes da aquicultura (38,4%). Da produção aquícola cerca de 392.492 toneladas tiveram origem na aquicultura continental (82,36%), enquanto que a aquicultura marinha gerou 84.020 toneladas (17,63%). A região Nordeste se destacou nas atividades de cultivo, sendo a maior produtora em 2013, com 140.748 toneladas, seguida pela região Sul com 107.448 toneladas, Centro-Oeste com 105.010 toneladas, Norte com 73.009 toneladas e Sudeste com 50.297 toneladas (MPA/IBGE, 2013; PDA, 2015) como podemos observar na figura 1.

Figura 1: Gráfico demonstrando a produção aquícola brasileira por região.

Produção da aquicultura brasileira por região em 2013



Fonte: Dados extraídos do Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira 2015-2020

A aquicultura continental no Brasil tem como seu principal representante a piscicultura (cultivo de peixes). Na figura 2 podemos observar a regionalização da aquicultura brasileira e as principais espécies cultivadas em cada região.

Figura 2: Principais espécies cultivadas no país por região.



Fonte: Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira 2015-2020.

2.2 TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*), figura 3, pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Characidae, ocorre naturalmente nas bacias do rio Amazonas e Orinoco (Gomes et al., 2010). Espécie reofílica de grande resistência à hipoxia (baixos teores de oxigênio) graças a sua capacidade de expansão do lábio inferior que lhe permite captar e direcionar a água das camadas mais superficiais para as brânquias (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Esta espécie faz parte do grupo conhecido como peixes redondos, composto além dele por Pacu (*Piaractus*

mesopotamicus) e Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), que são de grande importância para a piscicultura brasileira (Kubtiza, 2004).

.Figura 3: Exemplar adulto de Tambaqui (*C. macropomum*).



Fonte: <http://pescariamadora.blogspot.com.br/2012/03/diferenca-entre-tambaqui-tambacu->

É um peixe de água doce que pode alcançar até 1 m de comprimento e 30 kg de peso corporal em seu habitat (Goulding & Carvalho, 1982). Seu nome popular tem origem na língua tupi e significa resíduo de ostra. Caracteriza-se por possuir lábios carnosos, dentes molares afiados e fortes, algo que lhe permite uma alimentação onívora que varia desde o zooplâncton até sementes de frutas a medida que o animal cresce (Araújo-Lima & Goulding, 1998).

Sua maturidade sexual é atingida em torno dos 3 ou 4 anos. O Tambaqui é um peixe reofílico, precisa vencer a força da correnteza dos cursos de água, passando assim pelo processo conhecido como piracema, para maturar suas gônadas. Dessa forma o peixe não desova naturalmente em cativeiro (Proença & Bittencourt, 1994).

Trata-se de uma espécie de grande importância para a piscicultura devido a características como: aceitação a ração comercial, crescimento rápido, rusticidade, alta resistência a doenças, adaptação as etapas de manejo e variações nas características físicas e químicas da água (Chagas et al., 2007; Gomes et al., 2010).

Mesmo sendo possível cultivá-lo em todo o Brasil, há um alto risco de elevadas taxas de mortalidade durante os meses de inverno nos locais onde as águas podem atingir

temperaturas abaixo de 17°C, o que tem contribuído para as baixas cifras obtidos pelas regiões Sul e Sudeste (Kubitza & Kubitza, 2004). Para o desenvolvimento de atividades de cultivo bem-sucedidas com o tambaqui um dos critérios a ser atendido é que a temperatura da água fique em torno de 25 a 30°C (Silva & Gurgel, 1999). Como consequência disso as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste têm concentrado o cultivo de Tambaqui devido ao clima favorável e aceitação no mercado, uma vez que sua carne é muito apreciada devido ao sabor (Kubitza & Kubitza, 2004; Gomes et al., 2010).

Principal espécie nativa cultivada no Brasil, em 2015 foram produzidas 135,96 mil toneladas de Tambaqui, gerando um faturamento financeiro de 871.393 milhões de reais, sua produção correspondeu a 28,1% da produção aquícola nacional. A região Norte apresenta o maior percentual de cultivo, retendo 78,6% da produção. Dentro dessa região o estado de Rondônia se destaca por ser o maior produtor nacional de Tambaqui (IBGE, 2015). Observando a produção por regiões podemos obter a seguinte ordem por quantidade produzida: Norte (55.669 toneladas), Nordeste (18.282 toneladas), Centro-Oeste (14.062 toneladas), Sudeste (705 toneladas) e Sul (2 toneladas) (IBGE, 2013).

Devido à importante participação do tambaqui na aquicultura brasileira, uma vez que essa é a segunda espécie mais cultivada em território nacional, o uso de seus resíduos de processamento na obtenção de biomoléculas não só é de grande importância como também encontra-se registrado na literatura científica. A extração e caracterização de proteases ácidas e alcalinas a partir das vísceras do tambaqui foi primeiramente proposta por Bezerra^a et al. (2000). Subsequentemente uma tripsina termoestável parcialmente purificada foi obtida a partir do ceco pilórico deste animal (Bezerra^b et al., 2001). Em trabalho publicado por Espósito et al. (2009) proteases extraídas a partir das vísceras do tambaqui foram aplicadas como aditivos enzimáticos em detergentes para roupa.

2.3 CIOBA (*Lutjanus analis*)

A espécie conhecida popularmente como Cioba (*Lutjanus analis*) trata-se de um peixe demersal da família Lutjanidae pertencente à ordem Perciforme que é encontrada principalmente em águas costeiras de mares tropicais e subtropicais. Morfologicamente

se caracteriza por possuir uma nadadeira dorsal com 10 espinhos e 14 raios, além de ter uma mancha preta lateral abaixo dos primeiros raios da nadadeira dorsal e características listras, de cor azul clara, ocorrendo abaixo dos olhos (Menezes & Figueiredo, 1985), como mostra a figura 5. Os indivíduos vivem próximos aos recifes e fundos rochosos, sendo encontrados em profundidades de até 650 metros (Resende et al., 2003). Os representantes adultos desta espécie formam grandes cardumes aderidos às rochas, sendo possível encontrá-los em águas profundas da plataforma continental interna e externa. Os mais jovens se agrupam em águas litorâneas mais rasas, aderidas aos arrecifes (Fredou & Ferreira, 2005). Sua alimentação baseia-se no consumo de peixes, camarões, caranguejos, cefalópodes e gastrópodes (Froese & Pauly, 2009).

Figura 4: Exemplar de Cioba *L. analis* que apresenta as principais características relatadas na literatura.



Fonte: <http://graytaxidermy.com/mutton-snapper-fish-mount.html>

Quanto à ocorrência, os membros da espécie *L. analis*, são encontrados ocupando uma área que se estende desde o litoral do estado de Massachusetts, Estados Unidos, até as regiões litorâneas do sudeste brasileiro, sendo mais abundante no entorno das Antilhas, Bahamas e sul da Flórida (Acero & Garzón, 1985; Allen, 1985; Cervigón et al, 1992). Peixes ocorrentes em áreas de recife da família Lutjanidae são importantes para a pesca em diversas regiões do mundo. No Brasil o gênero *Lutjanus* inclui mais de 70 espécies (Starck & Shroeder, 1971). Esses peixes têm sido capturados de forma intensa pela atividade pesqueira realizada na região Nordeste do Brasil (Begossi et al., 2011; Frédou et al., 2009). Os peixes identificados como *L. analis* caracterizam-se por serem

bastante biodisponíveis, devido ao fato de estarem presentes em diferentes faixas de profundidade, e também por apresentarem intensa migração vertical devido a fatores bióticos e abióticos (Paiva, 1997). Dentre os peixes demersais a cioba está entre os seis principais peixes provindos do desembarque constituindo 75% do conteúdo junto a peixes como saramunete (*Pseudupeneus maculatus*), budião (*Pollachius pollachius*), sapuruna (*Haemulon spp.*), boca-torta (*Cetengraulis edentulus*) e guarajuba (*Carangoides bartholomaei*) (Lessa et al., 2011). A cioba mantém sua importância comercial devido ao seu valor de mercado e a qualidade de sua carne apesar de se situar atualmente como uma espécie quase ameaçada de extinção de acordo com a IUCN (International Union for Conservation of Nature). Os últimos dados relatados sobre sua pesca são do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura brasileiro e relatam um valor de 3014,5 toneladas para o ano de 2011. No entanto estudos recentes (Freitas et al., 2011; Sanches & Cerqueira, 2011) indicam que esse lutjanídeo tem grande potencial para ser empregado em atividades de cultivo.

2.4 CORVINA (*Micropogonias furnieri*)

Pertencente à família Sciaenidae, a corvina (*Micropogonias furnieri*), figura 6, é uma das espécies demersais mais abundantes, apresenta ampla distribuição, ocorrendo entre a Península de Yucatán (Golfo do México 20° N) e o Golfo de San Matias (Argentina, 41° S) (Isaac, 1988). Encontrada geralmente sobre fundos arenosos e de lodo em águas costeiras e em estuários ricos em alimentos. Os indivíduos adultos formam cardumes, alimentam-se de organismos bentônicos e capturam peixes. Crustáceos e moluscos bentônicos fazem parte da dieta de juvenis (Isaac, 1988).

Esses peixes que apresentam em média 45 cm de comprimento, podendo chegar ao tamanho máximo de 60 cm de comprimento, vivem em média sete anos e se caracterizam por apresentar um corpo prateado com bordas douradas e tons acinzentados, com distintas faixas oblíquas e escuras ao longo de linhas em escala que se estendem até abaixo da linha lateral. A espinha dorsal encontra-se destituída de pontos escuros e apresenta no total de 26 a 30 raios dorsais moles (Nakamura et al., 1986).

Figura 5: Exemplar adulto de corvina (*M. furnieri*) apresentando as principais características da espécie.



Fonte: <http://www.sentilapesca.com.ar/corvina-rubia-micropogonias-furnieri/>

No seu ciclo de vida a corvina apresenta desovas parceladas, em que uma única fêmea pode desovar de 3 a 7 milhões de ovos ao longo de uma estação reprodutiva que costuma ocorrer nos meses quentes e próxima a estuários ou em seu interior (Macchi et al., 2003). Os ovos planctônicos eclodem em aproximadamente 24 horas e as larvas medem aproximadamente 1,8 mm (Albuquerque, 2003).

A corvina possui uma grande importância alimentar sendo que em 2014 foram capturadas 106.236 toneladas em todo o mundo (FAO 2017). No Brasil esta espécie apresenta-se em maior densidade nas regiões Sul e Sudeste, tendo como consequência uma posição de destaque entre os peixes de valor comercial desembarcados, correspondendo à segunda espécie mais capturada nos últimos anos em território nacional (Freire et al., 2016; Mulato et al., 2015).

Devido à importância econômica desse peixe e as grandes quantidade de resíduos descartados em decorrência do processamento de seus volumes de captura, há diversos trabalhos na literatura recente objetivando o reaproveitamento dos seus resíduos. Em trabalho publicado em 2014 Cortez-Vega et al., utilizaram filmes obtidos da combinação de um isolado proteico de corvina com nanopartículas de argila para o aumento do tempo de bancada de fatias de mamão papaia; Zavareze et al., 2014, obtiveram a partir de músculos e subprodutos do processamento de *M. furnieri* um hidrolisado proteico encapsulado com potencial para aplicações na preservação de alimentos.

2.5 RESÍDUOS DE PROCESSAMENTO DO PESCADO E POSSÍVEIS APLICAÇÕES

Nas últimas décadas tem havido um aumento no consumo de produtos provindos de atividades da indústria pesqueira, principalmente peixes. Isso se deve ao fato deste alimento ser visto como um componente essencial a uma dieta saudável. Somando-se a isso o consumo *per capita* mundial de peixes aumentou de uma média de 9,9 Kg na década de 1960 para 20 Kg em 2014 (FAO, 2016).

No que diz respeito à indústria pesqueira, o Brasil se posiciona entre os principais produtores, tendo como consequência a geração de grandes quantidades de resíduos que podem representar uma perda superior a 50% da matéria-prima inicial (Costa & Souza, 2012). Os resíduos gerados no beneficiamento são vísceras, cauda, barbatana, escamas, pele, restos de carne e coluna vertebral (Feltus et al., 2010). Esses resíduos possuem uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos e seu uso consiste na obtenção de produtos com baixo valor agregado como farinha de peixe e fertilizantes (Seibel & Soares, 2003; Li et al., 2013). Mas há ainda situações em que essa matéria prima é simplesmente descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, tendo como consequência diversos efeitos negativos sobre ecossistemas marinhos. Quando não são descartados *in natura* no meio ambiente, esses resíduos possuem um oneroso processamento sanitário (Monte, 2016).

A reutilização dos subprodutos do pescado é um processo essencial para a conservação dos recursos marinhos, incremento de valor do pescado e economia de custos para empresas envolvidas na atividade pesqueira. Geralmente fábricas de processamento do pescado coletam os subprodutos gerados pela atividade portuária, produzindo um benefício econômico e ambiental. Diferentes produtos podem ser extraídos por uma atividade industrial que valorize o pescado enquanto empresas de pesca economizariam os custos associados à gestão de resíduos. Entretanto é de fundamental importância estimar as vantagens dos processos de valorização não apenas em termos econômicos, mas também considerando os impactos ambientais relacionados à atividade de valorização desses resíduos (Lopes et al., 2015).

Neste sentido o estabelecimento de métodos que valorizem os subprodutos do pescado se apresenta como uma alternativa fundamental. Conseqüentemente nas últimas décadas a pesquisa científica tem se esforçado para obter novos produtos de alto valor agregado a partir dos resíduos pesqueiros, tendo como resultado a obtenção de biomoléculas como quitina, quitosana, colágeno, gelatina, ácidos graxos ômega 3, taurina, creatina, enzimas, farinha e óleo de peixe a partir de biomassa indesejada (Kurita, 2006; Mondello et al., 2006; Bimbo, 2007; Alonso et al., 2010).

Diversos trabalhos recentes têm reportado o uso bem sucedido de resíduos da indústria pesqueira na obtenção e aplicação de biomoléculas. Em trabalho publicado Cahú et al. (2012) demonstraram ser possível o uso de um método capaz de obter diversas biomoléculas em série, proteínas, carotenóides, glicosaminoglicanos e quitina, a partir dos resíduos de processamento do *Litopenaeus vannamei*. A partir da quitina, após ser submetida a N-desacetilação, pode-se obter quitosana um polissacarídeo com diversas aplicações, dentre elas a construção de revestimentos para cicatrização de ferimentos e aumento do tempo de prateleira de alimentos (Fiber 1983; Souza et al., 2015; Aragão-Neto et al., 2016 Santos et al., 2017). Em estudo realizado por Silva et al. (2014) subprodutos como cabeças, ossos e vísceras de *Oreochromis niloticus* foram usados para a produção de hidrolisado protéico obtido a partir de hidrólise enzimática, processo que visa recuperar proteínas obtidas a partir de resíduos e gerar um produto com maior solubilidade (Martone et al., 2005).

A partir de resíduos como pele, ossos, escamas também é reportada a obtenção do colágeno, biomolécula de grande importância para indústrias do porte da farmácia e cosméticos por exemplo. Em trabalho recente com as escamas de *Sciaenops ocellatus* Chen^b et al. (2016) obtiveram colágeno tipo I com elevado grau de pureza e rendimento de 4,32%.

A medida que o desenvolvimento de diferentes processos de valoração adquira o status de solução para diminuir o desperdício dos subprodutos da pesca, faz se necessário avaliar os possíveis impactos adversos dessas atividades não só ao meio ambiente, como também a saúde humana. Isto contribui para compreender se os processos de valorização são de fato uma solução adequada para assegurar uma reutilização

sustentável dos subprodutos da indústria pesqueira em relação aos sistemas tradicionais de gestão dos resíduos (Lopes et al., 2015).

2.6 COLÁGENO

A matriz extracelular dos tecidos conjuntivos é formada por diversos tipos de proteínas que definem sua estrutura e funções fisiológicas. As suas características biofísicas são definidas pela disposição supramolecular de elementos fibrilares, redes microfibrilares, como também por proteínas, glicoproteínas e uma grande variedade de outras moléculas solúveis. Entre os diferentes tipos de tecido conjuntivo podemos encontrar variações na sua composição e estrutura. Quanto ao conteúdo proteico, as proteínas mais abundantes da matriz extracelular pertencem a família do colágeno, proteínas com estrutura molecular característica e que contribuem para a sustentação extracelular (Gelse et al., 2003).

O colágeno trata-se de uma proteína fibrosa com origem no reino animal que se caracteriza por ser o principal elemento estrutural de ossos, cartilagens, pele, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos, córneas, dentes, e demais órgãos (Senaratne et al., 2006). Possui a capacidade de formar fibras insolúveis e elásticas capazes de modular forças internas e externas exercidas sobre o organismo. Além de suas funções estruturais o colágeno também possui papel chave na orientação de tecidos em desenvolvimento (Kubota, 1997). Todas essas características fazem dessa proteína um importante elemento estrutural para os tecidos conectivos e demonstram que sua presença é essencial para todos os órgãos parenquimatosos e tecidos intersticiais (Gelse et al., 2003).

A estrutura molecular do colágeno se caracteriza por ser constituído de três cadeias alfa com polipeptídeos ligados entre si formando uma tripla hélice que é a unidade básica dessa proteína e denomina-se tropocolágeno. Fibras ligadas por pontes de hidrogênio que ocorrem entre grupos -NH de glicina e grupos carbonila C=O de resíduos localizados em outra cadeia polipeptídica ou pontes de hidrogênio com moléculas de água são responsáveis por manter consolidada a estrutura em tripla hélice. Outra característica estrutural inerente a esta proteína trata-se da repetição do arcabouço, (Gli-X- Y)_n,

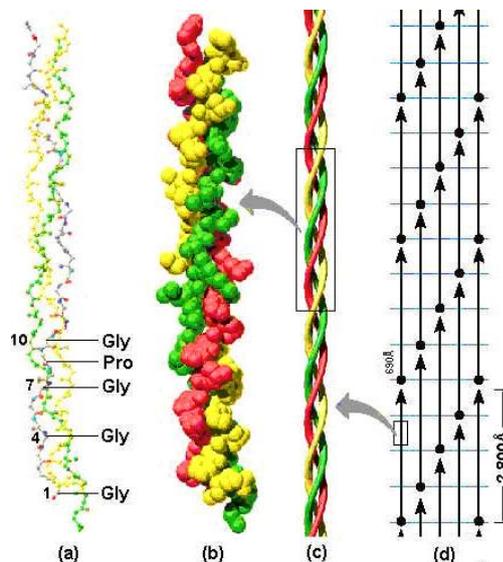
caracterizando um motivo comum a todos os tipos de colágeno. Além da glicina este arranjo costuma ter presente prolina e hidroxiprolina ocupando as posições X e Y (Figueiró, 2002; Gelse et al., 2003). Esta última modificação é dependente de vitamina C e representa uma pós-tradução significativa que ocorre a nível intracelular (Zeugolis, 2011). A estrutura em tripla hélice tem sua importância ligada a funções celulares como aderência e ativação da matriz extracelular, assim como também a funções enzimáticas como a hidroxilação dos resíduos lisina e prolina do colágeno (Fields, 1995).

O arcabouço em tripla hélice do colágeno é uma estrutura altamente conservada que se encontra presente em todas as variações dessa proteína. Mas em contraste com este fato, é possível evidenciar a presença de domínios não colagenosos entre os diferentes tipos de colágeno existente caracterizando uma diversidade estrutural e funcional as diferentes variações da proteína. Essa variedade contribui com a geração de estruturas que exigem a ação de enzimas específicas (colagenases) para a clivagem proteolítica. Um arranjo em tripla hélice com interrupções, por exemplo, contribui para que essa situação ocorra. As triplas hélices nativas são resistentes a ação de proteases como pepsina, tripsina e quimotripsina, sendo degradadas pelos diferentes tipos de colagenases específicas (Bruckner & Prockop, 1981; Goldberg, 1986).

Na literatura são relatados 29 tipos de colágeno classificados de I-XXIX que diferem de forma considerável quanto à estrutura, sequência e função. Todos os tipos de colágeno são sintetizados por uma variedade de células mesenquimais e epiteliais (Kielty & Grant, 2002). Esses diferentes tipos de colágeno são caracterizados por possuírem considerável complexidade, diversidade estrutural e variações na ocorrência de domínios não helicoidais. Os tipos I, II, III, V e XI aparecem com maior frequência, perfazendo cerca de 90% do conteúdo total, e são os colágenos formadores de fibrilas. O tipo I é o mais abundante e se faz presente em todos os tecidos conectivos, incluindo pele e ossos, conferindo resistência mecânica aos tecidos e órgãos e auxiliando na regulação do meio celular. Quanto à estrutura, o colágeno tipo I trata-se de um heteropolímero formado por dois tipos de cadeias α , duas $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$, em que a glicina constitui um terço do seu conteúdo de aminoácidos e possui baixos níveis de tirosina e histidina (McCormick, 2009; Ottani et al., 2004; Bailey et al., 1998; Ikoma et al., 2003; Muyonga et al., 2004). Sua via biosintética é constituída por oito enzimas específicas (Myllyharju & Kivirikko,

2001). A figura 7 esquematiza as características estruturais comuns a todos os tipos de colágeno.

Figura 6: Estrutura do colágeno: (a) forma de tríplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla; (d) modelo do quarto alternado pentafibrilar.



Fonte: http://ehlersdanlos-info-mas-mi-experiencia.blogspot.com.br/2011_05_01

A cerca de 700 milhões de anos o colágeno surgiu no metazoário mais antigo, as esponjas, sendo encontrado posteriormente em outros invertebrados como medusas, anêmonas do mar e corais (Huxley-Jones et al., 2007). A partir desse colágeno protótipo surgem evidências para compreender uma possível ramificação evolutiva que gerou os atualmente conhecidos 29 tipos de colágeno presentes nos vertebrados (Gordon, & M.; Hahn, 2010). Todos os tipos colágenos, principalmente os fibrilares, são tidos como os andaimes que mantêm as células no local e lhes permitem ancoragem ao mesmo tempo que conferem resistência tração e rigidez a um tecido (Zeugolis et al., 2011). Na figura 8 são listados os principais tipos de colágeno atualmente conhecidos.

Tabela 3: Tipos de colágeno, formas e distribuição nos tecidos

Tipo de Colágeno	Cadeias	Arranjo Molecular	Estrutura Supramolecular	$M_r \times 10^{-3}$ cadeias α	Tecido onde pode ser encontrado
------------------	---------	-------------------	--------------------------	---------------------------------------	---------------------------------

I	[a1(I)]2a2(I)	Monômeros escalonados até 67nm	Fibras com grande diâmetro na faixa de 67nm	95	Ossos, córnea, derme e tendão
II	[a1(II)]3	Monômeros escalonados até 67nm	Fibrilhas com 67nm	95	Cartilagem, tecido vítreo e zonas cartilaginosas do tendão
III	[a1(III)]3	Monômeros escalonados até 67nm	Fibrilas unidas com pequeno diâmetro em 67nm	95	Derme, aorta, útero, misturado ao tendão, intestino e vasos sanguíneos
IV	[a1(IV)]2a2(IV); a3(IV), a4(IV), a5(IV), a6(IV)	Associação de 4N- e 2C- terminais	Malha não fibrilar	170-180	Membranas basais
V	[a1(V)]2a2(V) [a1(V)a2(V)a3(V) [a1(V)]3	Monômeros escalonados até 67nm	Fibrilas unidas com 9nm de diâmetro	120-145	Derme do tecido embrionário/placentário, ossos e córnea
VI	[a1(VI)a2(VI)a3(VI)	Associação em tetrâmeros que se agregam ponta a ponta	Microfibrilas com friso de 5-10 nm de diâmetro, periodicidade de 100 nm	a1(VI) 140 a2(VI) 140 a3(VI) 340	Útero, derme cartilagem e músculos
VII	[a1(VIII)]2a2(VIII)	Agregamento lateral de dímeros antiparalelos	Ancoragem de fibrilas	170	Pele, membrana amniótica, córnea, epitélio mucoso
VIII	[a1(VIII)]2a2(VIII)	?	Rede hexagonal não fibrilar	61	Deiscência da membrana de células endoteliais
IX	[a1(IX)a2(IX)a3(IX)]	Superfície de fibrilas de colágeno II covalentemente reticuladas	FACIT; não fibrilar	68-115	Cartilagem, tecido vítreo e misturado ao tendão
X	[a1(X)]3	?	Rede hexagonal não fibrilar	59	Cartilagem calcificante (incluindo peças do tendão)
XI	[a1(XI)a2(XI)a3(XI)]	Monômeros escalonados até 67nm	Fibrilas finas semelhantes às do colágeno V	110-145	Cartilagem, disco invertebrado
XII	[a1(XII)]3	Associação superficial de fibrilas de colágeno	FACIT; não fibrilar	220-340	Derme, tendão e cartilagem
XIII	a1(XIII)	?	Membrana intercalada	62-67	Células endoteliais, epiderme
XIV	[a1(XIV)]3	?	FACIT; não fibrilar	220	Derme, tendão, cartilagem
XV	a1(XV)	?	Multiplex; não fibrilar	125	Placenta, rins, coração, ovários e testículos
XVI	a1(XVI)	?	FACIT; não fibrilar	150-160	Coração, rins e músculos
XVII	[a1 (XVII)]3	?	Membrana intercalada	180	Hemisossomos e epitélios especializados
XVIII	a1(XVIII)	?	Multiplex; não fibrilar	200	Rins e fígado
XIX	a1(XIX)	Agregados	FACIT; não fibrilar	165	Expressão embrionária transitória, interneurônios e formação de sinapses do hipocampo, membranas

					basais, células musculares, rabdmiossarcoma
XX	a1(XX)	?	FACIT	185, 170, 135	Córnea epitelial, pele embrionária, cartilagem externa e tendão
XXI	a1(XXI)	?	FACIT	?	Paredes dos vasos sanguíneos, células musculares lisas segregadas
XXII	a1(XXII)		FACIT	200	Junções de tecido
XXIII	a1(XXIII)		Membrana intercalada		Tumores da próstata
XXIV	a1(XXIV)		Associação de fibrilas		Regulação da fibrilogênese do colágeno I, marcador de diferenciação dos osteoblastos
XXV	a1(XXV)		Membrana intercalada		Interação com placas de β amiloide na doença de Alzheimer
XXVI	a1(XXVI)		FACIT	-80	Ovários e testículos
XXVII	a1(XXVII)	Redes	Fibras finas não estriadas		Cartilagem hipertrófica
XXVIII	a1(XXVIII)			-50	Membrana basal das células de Schwann
XXIX	a1(XXIX)	?	Não fibrilar		Células suprabasais epiderme

Fonte: Zeugolis et al (2011). Adaptado.

Os genes da matriz extracelular dos vertebrados surgiram principalmente da duplicação de genes e modificação de moléculas pré-existentes, todos funcionais até então devido a sua utilidade. Os tipos de colágeno remanescentes que sobreviveram ao teste evolutivo do tempo apresentam grande sensibilidade a mutações pontuais. Alterações em alguns aminoácidos, principalmente substituições de glicina das porções helicoidais levam a quadros patológicos e desordens teciduais (Zeugolis et al., 2011).

Geralmente os vários tipos de colágeno estão relacionados aos aspectos biomecânicos, mas além dessa função básica, essas proteínas possuem outras atribuições. Podendo atuar na sinalização celular; contribuir no armazenamento local de fatores de crescimento e citocinas, tendo assim um papel fundamental no desenvolvimento de órgãos, envolvimento em processos de cicatrização e reparo de tecidos (Yamaguchi & Ruoslathi, 1990). Essa capacidade de se vincular a fatores de crescimento e citocinas

credencia estas moléculas como veículos de transporte com potencial para fins terapêuticos e farmacológicos como entrega de fatores (Gelse et al., 2003).

O colágeno responde de forma sensível a variações de temperatura, fato que o caracteriza como uma proteína termoinstável. A sua estrutura química está ligada a esta sensibilidade, sendo o conteúdo de hidroxiprolina um fator determinante da sua estabilidade térmica. O conteúdo de hidroxiprolina e a estabilidade térmica são fatores de uma equação diretamente proporcional, em que um maior conteúdo deste aminoácido confere uma maior estabilidade térmica ao colágeno. Isso se deve ao fato deste aminoácido atuar formando ligações intercadeias por meio de pontes de hidrogênio tendo como resultado a estabilização da estrutura em tripla hélice (Gudmundsson & Hafsteinsson, 1997).

Propriedades como biodegradabilidade, baixa antigenicidade e ampla capacidade de adesão celular credenciam o colágeno tipo I como um importante biomaterial que é amplamente utilizado na confecção de cosméticos, alimentos, indústria farmacêutica, cultura de células, produção de gelatina fotográfica, indústria de couro, síntese de filmes para embalar alimentos e nas áreas de engenharia biomédica e tecidos (Ikoma et al., 2003; Woo et al., 2008; Liu et al., 2009). Na área farmacêutica o colágeno é utilizado na fabricação de implantes vítreos, carreadores de drogas, suporte para enzimas, produção de compostos biologicamente ativos. Na área médica essa proteína pode ser aplicada no tratamento de doenças angiogênicas, hipertensão, incontinência urinária e osteoartrite (Zhang et al., 2006; Woo et al., 2008). Dentre os biopolímeros, o colágeno é o material de origem animal mais abundante e fornecedor de uma ótima base para biomateriais. Depois de extraído, o colágeno pode ser processado para obtenção de filmes, membranas e fibras. Quanto à produção de filmes o colágeno é o material, de natureza proteica, mais empregado. Sua conversão em gelatina envolve a hidrólise catalisada por ácido, base ou aquecimento. Isso se deve ao fato da abundância dessa matéria prima que tem um baixo custo e possui excelentes propriedades funcionais (Poppe, 1997; Carvalho & Grosso, 2006; Kokoszka et al., 2010, Costa, 2012).

2.6.1 Fontes de Colágeno

Encontrado em quase toda totalidade do corpo de mamíferos, o colágeno é extraído principalmente da pele e tendões (fontes de colágeno tipo I) e tecidos cartilagosos (devido a sua abundância em colágeno tipo II) (Herbage et al., 1977). Ao longo dos anos diversos métodos foram testados no intuito de se isolar e purificar os vários tipos de colágeno provenientes dos mais diversos tecidos, sendo as extrações ácida e enzimática as mais comumente usadas nessa atividade (Zeugolis et al., 2011; Bhagwat & Dandge, 2016; Kozłowska et al., 2015; Yu et al., 2014).

Bovinos, suínos e aves ainda representam a principal fonte desta proteína (Chen^a et al., 2016), mas devido aos recorrentes casos de zoonoses mencionadas anteriormente e as já citadas barreiras religiosas presentes em grupos como Judeus, Muçulmanos, Hindus e Adventistas, a busca por fontes alternativas e mais seguras desse composto tornou-se uma opção atrativa (Ahmad & Benjakul et al., 2010; Durham, 2004). Neste cenário, animais marinhos como os peixes têm se destacado por serem uma possível fonte de colágeno capaz de atender as demandas da indústria, pois os resíduos de filetagem gerados pela indústria pesqueira que correspondem à pele, ossos, escamas e bexiga natatória, tecidos ricos em colágeno que podem representar até 75% do peso total das capturas (Huang et al., 2016; Gómez-Guillén et al., 2011; Muyonga et al., 2004). Além disso, esses animais apresentam vantagens como a ausência de restrições religiosas, grande disponibilidade, baixos riscos de transmissão de doenças, elevados rendimentos de extração e ausência de toxicidade (Senaratne et al., 2006).

Em SDS-PAGE o colágeno tipo I encontrado em peixes é constituído por 2 tipos de cadeias α (α_1 e α_2) em uma razão de 2:1 em termos de intensidade com as cadeias α_1 apresentando intensidade duas vezes maior que α_2 e as subunidades β e γ apresentando massa molecular acima de 200 kDa, fato que o torna muito similar ao colágeno de animais terrestres evidenciando o grau evolutivo de preservação da molécula (Foegeding et al., 1996; Singh et al., 2011). Nesses organismos marinhos ocorre uma variação no conteúdo de aminoácidos, em especial nos níveis de prolina e hidroxiprolina, variação essa que ocorre de espécie para espécie (Gudmundsson & Hafsteinsson, 1997). Para extrair o colágeno a partir dos tecidos de peixes, pode-se fazer o uso de ácidos orgânicos e

inorgânicos, além do uso de extrações enzimáticas. Estudos com diferentes animais marinhos têm encontrado ampla variação no rendimento de extração. Sionkowska et al. (2015) obtiveram um rendimento de 1,50% para *Brama australis*, enquanto que Veeruraj et al. (2015) encontraram um rendimento de 81,4% para *Doryteuthis singhalensis*.

Para obtenção do colágeno com certo grau de pureza são utilizadas várias etapas de pré-tratamento visando remover proteínas solúveis. Sua extração dos tecidos pode ser feita com o uso de ácidos orgânicos (ácido cítrico, por exemplo) ou inorgânicos (HCl) (Sadowska et al., 2003; Skierka & Sadowska, 2007). Soluções ácidas embora sejam eficazes na dissociação de ligações cruzadas intermoleculares do tipo aldimina, possuem menor eficiência diante de ligações mais estáveis como as cetoiminas. Neste contexto metodologias que têm como base extrações enzimáticas com o emprego de enzimas proteolíticas possuem maior eficácia devido à clivagem seletiva na região não helicoidal, telopeptídeos N- e C- terminais que permitem a extração de hélices intactas e sem nenhum comprometimento estrutural (Na et al., 1986; Zeugolis et al., 2011).

O colágeno resultante deste processo tem como vantagem a remoção do determinante antigênico P localizado nos telopeptídeos E. Em consequência disso a resposta imune de um possível hospedeiro pode ser reduzida, tendo como resultado a produção de um biomaterial mais competitivo no mercado clínico (Ishikawa et al., 2001; Lynn et al., 2004; Bonassar et al., 1998).

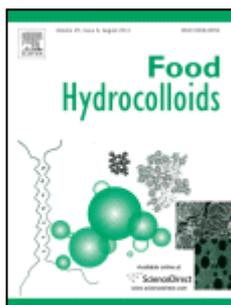
3 OBJETIVO GERAL

Extrair e caracterizar colágeno obtido a partir dos resíduos de processamento de peixes que ocorrem em território nacional e têm significativa importância econômica na cadeia produtiva, assim como também sugerir sua utilização como fonte alternativa ao colágeno proveniente de animais terrestres.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair colágeno ácido solúvel (CAS) e pepsino solúvel (CPS) a partir dos resíduos das seguintes espécies de peixe: cioba (*L. analis*); corvina (*M. furnieri*); tambaqui (*C. macropomum*);
- Propor modificações nos métodos usuais de extração do colágeno visando tornar o processo mais economicamente viável;
- Determinar o rendimento da extração do colágeno CAS e CPS;
- Caracterizar parâmetros de extração e solubilidade do colágeno CAS e CPS;
- Estabelecer grau de pureza e determinar o tipo de colágeno obtido;
- Determinar o peso molecular aparente das amostras obtidas de *L. analis*, *M. furnieri*, *C. macropomum*, através de SDS-PAGE;
- Determinar a temperatura máxima de transição do colágeno extraído;
- Caracterizar o perfil proteico do colágeno obtido no processo de extração;

**4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO A PARTIR
DAS ESCAMAS DA CIOBA (*Lutjanus analis*)**



A ser submetido ao periódico

Após a sua tradução para língua inglesa

FOOD HYDROCOLLOIDS

(ISSN: 0268-005X)

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO A PARTIR
DAS ESCAMAS DA CIOBA (*Lutjanus analis*)**

Neri, R. C. A.; Costa, H. M. S.; Freitas JR., A.C.V.; SANCHEZ, L. C. M.; SANTA-CRUZ, P. A.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO JR, L. B.

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

Corresponding author:

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária,

50670-420, Recife-PE, Brazil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

email: ransoube@uol.com.br

RESUMO

O colágeno extraído a partir das escamas da cioba (*Lutjanus analis*) mostraram valores de rendimento de 3,5% e 6,5% para o colágeno solubilizado em ácido (CAS) e colágeno solubilizado em pepsina (CPS) respectivamente. Através da técnica de eletroforese foi possível observar que tanto CAS como CPS consistiam de padrões de bandas formados por uma cadeia γ , uma cadeia β e duas cadeias α distintas (α_1 e α_2), caracterizando o colágeno extraído como sendo do tipo I. O CPS possui um menor peso molecular em relação ao CAS devido ao menor número de ligações cruzadas. Em espectro de absorção de raios ultravioleta (UV) foram encontrados picos de 239nm e 236nm para CAS e CPS. A solubilidade máxima foi observada na faixa ácida (pH 1-6) e ocorreu uma diminuição acentuada desta solubilidade em concentrações de 4% (p/v) e 5% (p/v) de NaCl para CAS e CPS respectivamente. Em um termograma aferiu-se a temperatura máxima de transição que encontrou os valores de 76° C e 77° C para CAS e CPS respectivamente. Em análise do conteúdo de aminoácidos verificou-se o predomínio do conteúdo de glicina, característico como aminoácido predominante no colágeno e considerável percentual de iminoácidos, responsáveis por conferir estabilidade térmica a molécula.

Palavras-Chave: Peixe, Colageno, Escamas, Proteinas, Pepsina, Cioba, *Lutjanus analis*

1. INTRODUÇÃO

O colágeno é uma proteína estrutural que equivale a 30% do conteúdo total de proteínas presentes nos vertebrados (Muyonga et al., 2004). Principal elemento estrutural de ossos, cartilagens, pele, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos, dentes e outras estruturas presentes nos vertebrados, essa proteína de características fibrosas possui a capacidade de formar fibras insolúveis altamente resistentes a tração. Em termos estruturais o colágeno se caracteriza por apresentar três cadeias polipeptídicas unidas entre si formando uma tripla hélice (Gelse et al., 2003; McCormick, 2009; Senaratne et al., 2006).

Há 29 tipos de colágenos catalogados na literatura sendo o tipo I o mais recorrente, encontrado em todos os tecidos conjuntivos, é responsável por conferir resistência mecânica a tecidos e contribui para a regulação do ambiente celular (Nagai et al., 2008; Ikoma et al., 2003; Muyonga et al., 2004).

Amplamente utilizado na indústria farmacêutica, indústria de alimentos e produtos cosméticos devido a propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa antigenicidade, o colágeno é obtido principalmente dos subprodutos do processamento de animais terrestres como bovinos, suínos e aves (Liu et al., 2009). Entretanto casos recorrentes de zoonoses como encefalopatia espongiforme transmissível (EET), encefalopatia espongiforme (EE), febre aftosa (FA) e gripe aviária têm gerado receio na indústria, despertado o interesse por fontes mais seguras desta proteína, tornando a busca de fontes alternativas um investimento atrativo (Zhang et al., 2007).

Neste cenário os peixes têm ganhado destaque como uma possível fonte frente ao colágeno extraído de animais terrestres. Fatores como grande disponibilidade, baixo risco de transmitir doenças, alto rendimento nos processos de extração e ausência de toxicidade têm contribuído para o surgimento de novos estudos com o objetivo de extrair colágeno a partir de peixes. Devido à grande distância evolutiva entre esses organismos e os seres humanos, o risco de transmissão de doenças por essa via torna-se muito baixo (Song et al., 2006). Nos últimos anos vários trabalhos têm relatado extrações bem-

sucedidas a partir de resíduos como pele, ossos e escamas de peixes como o *Priacanthus tayenus* e *Priacanthus macracanthus* (Benjakul et al., 2010); *Pagrus major* e *Oreochromis niloticus* (Ikoma et al., 2003); *Lates niloticus* (Muyonga et al., 2004); *Sephia pharaonis* (Aewsiri et al., 2009).

O processamento de peixes gera uma grande quantidade de resíduos como pele, ossos, nadadeiras, escamas e vísceras que são descartados no meio ambiente sem nenhum tratamento sanitário, causando graves problemas ambientais. Por possuir um processamento sanitário oneroso para a indústria do pescado, a utilização destes resíduos objetivando a obtenção de biomoléculas têm sido relatada como uma forma de reaproveitamento deste material (Gildeberg, 1992).

A cioba (*Lutjanus analis*) é uma espécie de peixe demersal pertencente à família Lutjanidae que habita águas costeiras de mares tropicais e subtropicais, vivendo próximo a recifes e fundos rochosos em profundidades de até 650 metros (Resende et al., 2003). Os indivíduos adultos formam grandes cardumes vivendo próximos as rochas de águas costeiras (Frédou & Ferreira, 2005). Devido a sua biodisponibilidade a cioba possui significativo valor comercial, sendo sua produção bastante rentável em algumas regiões do Brasil (Resende et al., 2003). Em 2010 sua produção foi de 2987 toneladas (MPA, 2010).

Este trabalho teve como objetivo extrair e caracterizar o colágeno obtido a partir das escamas da cioba e sugerir sua utilização como uma fonte alternativa ao colágeno proveniente de animais terrestres.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

As escamas do peixe cioba (*L. analis*) foram obtidas a partir da indústria pesqueira local. Após a coleta, o material foi lavado com água destilada e armazenado a -20°C para posterior utilização.

2.2 EXTRAÇÃO DO COLÁGENO DAS ESCAMAS

A extração do colágeno das escamas realizou-se em duas etapas sequenciais. Na primeira etapa, as escamas do peixe foram desmineralizadas com EDTA e após isso fez-se a remoção de outras proteínas como o uso de NaOH. Na segunda, o colágeno foi isolado através do tratamento com ácido acético. Ambas as etapas ocorrerão a 4°C com homogeneização constante (Fruchour & Koenig, 1975).

As escamas desmineralizadas foram tratadas com ácido acético 0,5M, pH 2,5, por um período de 48 horas. O material obtido foi precipitado utilizando NaCl 0,9M durante 24 horas, seguido por centrifugação a 8000 rpm por 1 hora à 4°C. As etapas de precipitação e centrifugação repetiram-se por 3 vezes. O precipitado foi novamente solubilizado em ácido acético 0,5M, dialisado em ácido acético 0,1M, água destilada e por fim liofilizado (Fruchour e Koenig, 1975). Obteve-se o colágeno ácido solúvel (CAS).

O colágeno pepsino solúvel foi obtido pela incubação do material insolúvel obtido nas etapas anteriores com pepsina comercial (EC 3.4.23.1; cristalizada e liofilizada, Sigma, MO) na proporção de 1:6 (p/v) com homogeneização constante por 72h à 4°C, seguido por precipitação salina diferencial (Mizuta et al., 2003), denominando-se a amostra obtida como colágeno pepsino solúvel (CPS).

2.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) seguiu o protocolo estabelecido por Laemmli (1970) usando tampão Tris-HCl /glicina, e gel de corrida a 7,5% e gel de concentração a 4%. Para a detecção das bandas protéicas utilizou-se o corante Azul de Coomassie. O gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (0,5% p/v), metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) e em seguida, descorado com ácido acético 10% (v/v).

2.4 ESPECTRO ULTRAVIOLETA

Os espectros de absorção de raios ultravioleta de CAS e CPS foram medidos em um espectrofotômetro Bio-Rad. Amostras de colágeno foram dissolvidas em ácido acético 0,5 M até se obter soluções com concentração de 1mg/ml. Por fim as soluções foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e a absorção na faixa do ultravioleta se deu em comprimentos variando entre 200-600 nm (Zeng et al., 2012).

2.5 MEDIÇÃO DA TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO TÉRMICA

As amostras de colágeno foram preparadas pelo método descrito por Rochdi et al (2000). Amostras liofilizadas de colágeno foram reidratadas em solução de ácido acético 0,05 M numa relação de 1:40 (p/v). As amostras foram solubilizadas durante 48 horas a 4°C. Mediu-se a transição térmica em um Differential Scanning Calorimeter DCS-60 Shimadzu onde o termograma do alumínio foi utilizado como padrão para calibrar a temperatura. As amostras reidratadas (5-10mg) foram pesadas em panelas de precisão constituídas de alumínio, seladas e por fim verificadas em intervalos de temperatura variando entre 25 e 100°C com uma taxa de aquecimento de 1°C/minuto. A máxima temperatura de transição (T_{max}) foi calculada a partir do pico máximo de transição obtido nas medições do DSC.

2.6 PARÂMETROS DE SOLUBILIDADE

A solubilidade das amostras de colágeno ácido solúvel (CAS) e pepsino solúvel (CPS) foi determinada seguindo a metodologia de Montero et al. (1991). As amostras obtidas foram dissolvidas em ácido acético 0,5M para a obtenção de uma solução final com concentração de 3mg/ml. A mistura foi agitada a 4°C por 24 horas, seguido por centrifugação a 5000xg durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para estudos de solubilidade descritos abaixo.

2.7 EFEITO DO PH NA SOLUBILIDADE

O efeito do pH sobre a solubilidade do CAS e CPS foi avaliado segundo Singh et al. (2011). As amostras obtidas (3mg/ml, 8mL) foram incubadas com HCl 6M ou NaOH 6M com o intuito de obter o pH final variando entre 1-10, seguido de centrifugação a 20000xg durante 30 minutos a 4°C.

2.8 EFEITO DO NaCl NA SOLUBILIDADE

O efeito do NaCl sobre a solubilidade do CAS e CPS foi avaliado segundo Singh et al. (2011). As amostras obtidas (6mg/mL, 5mL) foram incubados com 5mL de NaCl em ácido acético 0,5M em diferentes concentrações (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6% v/v), seguido de centrifugação a 20.000xg por 30 minutos a 4°C.

2.9 ESPECTROSCOPIA FTIR

Os espectros infra-vermelho d colagénio de *Lutjanus analis* foram registados utilizando um espectrofotómetro FTIR Genesis II (Mattson, EUA) equipado com um dispositivo ATR (MIRacle™ PIKE Technologies) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Todos os espectros foram registados em modo de absorção a intervalos de 4 cm⁻¹ e 64 scans (Sionkowska et al., 2015).

2.10 AMINOGRAMA

O conteúdo de aminoácidos das amostras de colágeno foi determinado pelo Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, USP). As amostras liofilizadas de colágeno foram hidrolisadas em HCl 6N com fenol a 0,01% (v/v) a 110 °C durante 22 horas. O grau de hidroxilação de prolina e hidroxiprolina foi calculado como percentual de imino ácidos.

2.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos em média±desvio padrão. Os valores das médias foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Tukey. As análises foram feitas utilizando o programa estatístico MicroCal[®] Origin[®] Version 8.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO COLÁGENO CAS E CPS

O rendimento total de colágeno extraído a partir das escamas da Cioba foi de 10% do peso seco, sendo 3,15% de CAS e 6,85% de CPS. Esse resultado mostra que o colágeno presente na escama, assim como em outros tecidos, não é completamente solubilizado em ácido acético 0,5M. Com o CPS apresentando maior rendimento de extração, podemos afirmar que as moléculas de colágeno podem ser altamente reticuladas por ligações covalentes transversais que ocorrem através da condensação de grupos aldeídos nas regiões telopeptídicas e intermoleculares do colágeno, fato esse que causa uma diminuição na solubilidade da proteína em ácido acético (Foegeding et al, 1996,.. Zhang et al, 2007). Ao submeter o resíduo da extração com ácido acético à ação da pepsina, obtendo-se como resultado a clivagem da região telopeptídica e a hidrólise das ligações cruzadas (Balian & Bowes, 1977).

Em outros trabalhos relatados na literatura foram encontrados os seguintes rendimentos para a extração de colágeno a partir de escamas: *Hypophthalmichthys molitrix* (1,45%) (Zhang, Duan Ye, e Konno, 2010), *Cololabis saira* (15%) (Mori et al., 2013), *Hypophthalmichthys nobilis* (2,7%) (Liu et al., 2012); pele: *Priacanthus tayenus* (10,9%) (Kittiphattanabawon et al., 2005), *Aluterus monóceros* (7,6%) (Ahmad & Benjakul, 2010), *Priacanthus tayenus* e *Priacanthus macracanthus* (7,7% e 7,1%) (Benjakul et al., 2010); e ossos: *Hypophthalmichthys nobilis* (2,9%) (Liu et al., 2012), *Lutjanus lutjanus* (1,6%) (Kittiphattanabawon et al., 2005). Essas variações no rendimento estão relacionadas tanto as diferentes condições biológicas, as quais cada espécie está submetida, como também as condições e métodos de extração (McCormick,

2009; Zhou & Regenstein 2007). Ainda vale salientar que as diferenças estruturais do colágeno tem relação direta com o rendimento da extração, pois se as moléculas na região telopeptídica forem altamente reticuladas a solubilidade do colágeno em ácido tende a diminuir (Foegeding et al., 1996).

3.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Os padrões de colágeno CAS e CPS como mostra a figura 3 apresentaram uma distribuição de bandas bem semelhante às encontradas no colágeno bovino e na maioria dos peixes (Singh et al., 2011; Li et al., 2013; Zeng et al., 2012; Motowidło et al., 2008). Isso mostra que o colágeno extraído das escamas de Cioba possa ser provavelmente o tipo I. Observa-se que na região entre 100 e 120 KDa estão as duas bandas α (α_1 e α_2) (Foegeding et al., 1996) e na região de 200 KDa ou mais podemos encontrar as bandas β e γ . Na coluna onde ocorreu a corrida para o CAS vê-se que α_1 é muito maior que α_2 . Ainda observando o padrão encontrado para o CAS verificamos a presença de uma grande quantidade de proteínas com ligações cruzadas, fato esse evidenciado pela diferença no tamanho das bandas β de CAS, mais intensa, e CPS, menor intensidade (Sato et al., 2000). Esse fato pode explicar a dificuldade na solubilização do colágeno em solução ácida, fazendo necessário o uso da pepsina, pois de acordo com estes resultados podemos inferir que a pepsina atuaria clivando as ligações transversais contidas nas regiões telopeptídicas das cadeias β (Miller, 1972).

3.3 ESPECTRO ULTRAVIOLETA

Na tabela 1 é mostrado que tanto o colágeno CAS e o CPS possuem maior taxa de absorvância dos raios ultravioleta na faixa de 236 e 239 nm respectivamente, resultado semelhante ao encontrado para *Diodon holocanthus*, 210-240 nm (Huang et al., 2011); colágeno de pele de rã, 236nm (Li et al., 2004); *Ictalurus punctatus* 236nm (Liu et al., 2007); *Theragra chalcogramma*, 220 nm (Yan et al., 2008). A absorção máxima, na região ultravioleta, para as proteínas ocorre em comprimentos de onda próximos a 280 nm (Duan et al., 2009). O espectro de absorção de raios ultravioleta pode medir o teor de tirosina e fenilalanina, além de ser capaz de medir a integridade dos telopeptídeos não

helicoidais (Na, 1988). Os aminoácidos fenilalanina e tirosina são cromóforos sensíveis e absorvem os raios ultravioleta na faixa entre 251 e 283 nm (Liu & Liu, 2006). Na grande maioria dos trabalhos relacionados aos processos de extração e caracterização do colágeno é relatada uma pequena quantidade desses aminoácidos no conteúdo proteico (Singh et al., 2011; Huang et al., 2011; Yan et al., 2008; Lin & Liu, 2006). Baseando-se nos dados recorrentes na literatura e se utilizando da propriedade de a fenilalanina e a tirosina serem cromóforos, podemos de acordo com Liu & Liu expressar a integridade das regiões telopeptídicas não helicoidais e verificar a presença de proteínas contaminantes quando se dá a extração e purificação do colágeno a partir dos níveis desses aminoácidos. Com isso, pode-se dizer que o material extraído neste trabalho tanto por processos com ácido acético como também com pepsina trata-se de colágeno tipo I, pois seus níveis de absorvância ocorreram em faixas que compreendem a ocorrência dessa proteína.

3.4 SOLUBILIDADE DO COLÁGENO

Efeito do pH

Quando o CAS e CPS, solubilizados em 0,5M de ácido acético, foram submetidos a variações de pH verificou-se que ambos os tipos de colágeno obtiveram maior solubilidade em faixas de pH ácido, apresentando pequenas variações de solubilidade ao longo dessa faixa como mostra a figura 4. Sendo que as maiores solubilidades alcançadas foram em pH 1 para o CAS e 3 para o CPS. Uma acentuada perda de solubilidade de ambas as amostras é alcançada quando o pH das soluções chega a uma faixa neutra (pH 7,0) e alcança seu valor mínimo em pH 9 e 8, respectivamente para CAS e CPS. Quando o pH do meio em que se encontra o colágeno atinge um valor igual ou próximo ao ponto isoelétrico (pI), há uma redução na solubilidade causada por uma redução no valor das cargas moleculares (Vojdani, 1996). Em seu trabalho Foegeding et al., (1996) relatam o pI do colágeno variando entre 6-9. Neste ponto as cargas líquidas das moléculas que constituem a proteína são iguais a zero e com isso há um aumento das interações hidrofóbicas resultando assim na precipitação e agregação da proteína (Singh et al., 2011). Curvas apresentando comportamento similar foram

encontradas nos seguintes trabalhos: Li et al., 2013; Jongjareonrak et al., 2005; Huang et al., 2011; Nalinanon et al., 2007.

3.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl

A figura 5 representa o efeito do NaCl sobre a solubilidade de CPS e CAS extraídos da Cioba. Para o CAS diluído em ácido acético 0,5M a proteína começa a precipitar numa concentração de 2% e tem um grande percentual precipitado quando a concentração de NaCl alcança 8%. O CPS se mantém estável mediante grande parte das variações na concentração de NaCl, tendo um sutil aumento da precipitação em uma concentração de 6% do NaCl e uma precipitação de grande parte do seu conteúdo quando o sal atinge uma concentração de 10% na solução. Quando a concentração de NaCl atinge valores elevados numa solução, é desencadeado o efeito “salting out” que contribui para a redução da solubilidade do colágeno (Asghar & Henrickson, 1982). Outro fator importante está relacionado ao aumento da força iônica gerado pelo NaCl, que tem como efeito a redução de solubilidade das proteínas por causa do aumento de interações hidrofóbicas entre as suas cadeias e o aumento da competição por água com os sais iônicos (Vojdani, 1996). Curvas de tendência seguindo um padrão em que o CAS é mais susceptível a variações na concentração de NaCl do que o CPS são comumente relatados na literatura, peixe gato listrado (Singh et al., 2011); peixe pargo marrom listrado (Jongjareonrak et al., 2005); cobia (Zeng et al., 2012); cavala (Li et al., 2013); peixe balão (Huang et al., 2011). O CAS pode ser mais solúvel mediante a variações na concentração de NaCl devido a hidrólise promovida pela pepsina em regiões onde ocorrem ligações cruzadas entre moléculas de elevado peso molecular (Singh et al., 2011).

3.6 ESTABILIDADE TÉRMICA

A figura 6 mostra os padrões de DSC seguidos pelas amostras CAS e CPS da cioba que se caracterizam por apresentarem picos endotérmicos entre 76°C e 78°C respectivamente. Fatores como a temperatura fisiológica do peixe podem desempenhar um importante papel na determinação da estabilidade térmica do colágeno, mas um dos principais fatores que tem influência direta aqui é o conteúdo de aminoácidos, sendo da

hidroxiprolina o papel de destaque, pois a mesma mantém a estabilidade dos trímeros do colágeno. Com isso é possível estabelecer uma relação linear entre a temperatura máxima de transição (T_{max}) e o percentual de hidroxiprolina no conteúdo de aminoácidos (Sikorski, Scott, & Buisson, 1984). Podemos dizer que a técnica de DSC encontrou T_{max} próximas para ambos os tipos de colágeno, indicando que a digestão por pepsina provavelmente não afeta a estrutura em tripla hélice do colágeno (Hickman et al., 2000). Comparando com outros resultados encontrados na literatura, *Lutjanus vitta* 30,52 e 30,46°C (Jongjareonrak et al., 2005); *Rachycentron canadum* 38,13 e 36,03°C (Zeng et al., 2012); *Theragra chalcogramma* 46,96°C (Yan et al., 2008), verifica-se que a T_{max} foi superior a encontrada na maioria dos organismos aquáticos. Esses resultados demonstraram também um colágeno com T_{max} superior ao proveniente de animais terrestres, colágeno de pele bovina 36,3°C (Ogawa et al., 2003). Os níveis de hidroxiprolina podem estar ligados a essa estabilidade térmica (Kimura et al., 1993). Em trabalhos como: obtenção de filmes de colágeno a partir da bexiga natatório (Fernandes et al., 2008); *Stichopus japonicus* (Cui et al., 2007); caracterização de colágeno de Sipunculida (Rong Su et al., 2009), foram encontrados resultados similares ao encontrado neste trabalho, sendo que Fernandes et al., encontraram temperaturas de 65,9°C, 70,9° e 74,8°C para filmes de colágeno obtidos a partir dos peixes, Pescada Amarela, Guarijuba e Pescada Branca respectivamente.

3.7 ESPECTROSCOPIA FTIR

O espectro infravermelho de CAS e CPS obtido a partir das escamas da cioba é apresentado na figura 6. Normalmente associadas a vibração de estiramento de ligações N-H, que ocorre na faixa entre 3400 cm^{-1} e 3340 cm^{-1} , o pico para a Amida A ocorreu em 3300 cm^{-1} para o CPS e 3282 cm^{-1} para o CAS provavelmente devido ao envolvimento de grupamentos NH de peptídeos em ligações com o hidrogênio (Li et al., 2004; Pati et al., 2010). Resultados similares foram encontrados para outras espécies de peixes (Muyonga et al., 2004; Nagai et al., 2008 e Veeruraj et al., 2013). A amida B representa o alongamento assimétrico de CH_2 (Muyonga et al., 2004) e foi encontrada em 2908 e 2923 cm^{-1} para CAS e CPS respectivamente. Porções correspondentes a Amida I possuem frequências de estiramento entre 1600 e 1700 cm^{-1} e estão associadas a vibrações de

estiramento de grupos carbonila (C=O) ao longo do esqueleto polipeptídico (Payne & Veis, 1988). Essa é uma região indicadora da presença de estruturas secundárias (Surewicz & Mantsch, 1988). As bandas correspondentes a Amida I para CAS e CPS foram encontradas em 1642 e 1617 cm^{-1} respectivamente. A banda de Amida II encontrou-se situada em 1550 cm^{-1} para ambos os tipos de colágeno extraído, enquanto que a banda de Amida III de CAS e CPS foi localizada em 1234 e 1039 cm^{-1} , respectivamente. Essas bandas representam vibrações de estiramento de grupamentos N-H em conjunto com C-N e C-H, respectivamente (Barth & Zscherp, 2002; Payne & Veis, 1988). Esses resultados demonstram que o processo de extração enzimático provocou alterações estruturais na molécula de colágeno sem, no entanto, comprometer sua estrutura básica.

3.8 AMINOGRAMA

O CPS das escamas do *L. analis* tem seu teor de aminoácidos apresentado na tabela 2. O colágeno apresentou a glicina como principal resíduo (193,73 resíduos de glicina/1000 resíduos de aminoácidos) seguido por prolina (106,77/1000), ácido glutâmico (57,66/1000), hidroxiprolina (87,55/1000), e alanina (89,55/1000). Resultados similares foram relatados para outros organismos aquáticos (Liu et al., 2014; Thuy et al., 2014; Veeruraj et al., 2013; Veeruraj et al., 2014; Wang et al., 2014). Geralmente a glicina corresponde a um terço da quantidade total de resíduos de aminoácidos que compõe o colágeno e ocorre em toda a região central da cadeia, diferenciando-se dos primeiros 14 resíduos N- terminais e dos 10 resíduos C- terminais (Foegeding et al., 1996). Conteúdos de tirosina, histidina e isoleucina se apresentaram em baixas quantidades e quantidades insignificantes de cisteína foram encontradas. O triptofano não foi detectado nestas análises. Esses resultados foram similares ao que é relatado na literatura por Huang et al., 2011; Nalinanon et al., 2011; Singh et al., 2011; Veeruraj et al., 2013. O teor de iminoácidos apresentado foi de 193,65/1000, resultado similar ao encontrado para o peixe balão (174/1000) (Huang et al., 2011), peixes voadores (178/1000) (Thuy et al., 2014), ell-fish marinho (200/1000) (Veeruraj et al., 2013). O conteúdo de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) contribui para a estabilidade das estruturas helicoidais do colágeno e são um importante fator na estimativa da estabilidade térmica do colágeno

(Kittiphattanabawon et al., 2010; Liu et al., 2012). De acordo com Bae et al., 2008, os anéis de pirrolidina, prolina e hidroxiprolina impõem restrições na conformação de uma cadeia polipeptídica e ajudam a fortalecer a tripla hélice. Além disso zonas ricas na combinação de Pro + Hyp estão envolvidas na formação de zonas de junção estabilizadas por pontes de hidrogênio. Adicionalmente o teor de iminoácidos está associado as médias de temperatura apresentadas pelas regiões em que vivem determinados peixes (Bae et al., 2008).

4. CONCLUSÃO

Colágeno ácido solúvel e pepsino solúvel foram extraídos a partir das escamas da cioba. Ambos apresentaram algumas diferenças em relação aos padrões físicos e químicos, pois continham comportamentos diferenciados quanto a precipitação mediante variações de pH e NaCl. A extração teve um alto grau de eficiência comprovado tanto pelo rendimento obtido a partir da extração das escamas, que são uma matéria prima abundante, como também pelo grau de pureza da proteína extraída. O uso da pepsina se mostrou útil devido ao rendimento alcançado e também ao grau de preservação das estruturas, comprovando que a mesma provocou poucas alterações no colágeno. Com os resultados obtidos tanto na eletroforese como no ensaio com ultravioleta, podemos constatar que o colágeno obtido no processo se trata do tipo I, que é o de maior interesse comercial. A temperatura máxima de transição foi elevada mesmo quando comparada a de animais terrestres. Esses resultados mostram que a extração de colágeno a partir de escamas da cioba (*L. analis*) para a geração de biomateriais é um investimento atrativo.

5. AGRADECIMENTOS

Esse estudo teve suporte financeiro das seguintes agências de fomento brasileiras: CAPES, CNPq, FINEP e FACEPE.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEWSIRI, T., et al. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, 115(1), 243-249, 2009.
- ALINA SIONKOWSKA, et al. Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. **International Journal of Biological Macromolecules**. V 80. p 605-609, 2015.
- Asghar, A., & Henrickson, R. L. Chemical, biochemical, functional and nutritional characteristics of collagen in food systems. In C. O. Chichester, E. M. Mrata, & B. S. Schweigert (Eds.), **Advances in food research** (vol. 28, pp. 237–273). London: Academic Press, 1982.
- BAE, I. et al. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 49–54, 2008.
- BALIAN, G., & BOWES, J. H. The structure and properties of collagen. In A. G. Ward & A. Courts (Eds.), **The science and technology of gelatin** (pp. 1–31). London: Academic Press, 1977.
- BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell about proteins. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 35, n. 4, p. S0033583502003815, 2002.
- BENJAKUL, S. et al. Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 132–138, 2010.
- Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil 2010. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). 129p, 2010.
- CUI, F. XIA et al. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1120–1125, 2007.
- DUAN, R. et al. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 702–706, 2009.
- FERNANDES, R. M. T. et al. Collagen films from swim bladders: Preparation method and properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, n. 1, p. 17–21, 2008.
- FOEGEDING, E.A., LANIER, T.C., HULTIN, H.O. Collagen, In: Fennema, O.R. (Ed.), **Food Chemistry**, 3rd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 902–906, 1996.
- FRÉDOU, T.; FERREIRA, B. P. Bathymetric trends of northeastern Brazilian snappers (pisces, lutjanidae): Implications for the reef fishery dynamic. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 787–800, 2005.

- FRUSHOUR, B. G.; KOENIG, J. L. Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. **Biopolymers**, v. 14, n. 2, p. 379–391, 1975.
- GELSE, K. et al. Collagens – Structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1531–1546, 2003.
- GILDBERG, A. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 271-276, 1992.
- HICKMAN, D. et al. Isinglass/collagen: Denaturation and functionality. **Journal of Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 245–257, 2000.
- HUANG, Y. R. et al. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1507–1513, 2011.
- IKOMA, T. et al. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32, p. 199–204, 2003.
- J. H. MUYONGA et al. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 85, p. 81-89, 2004.
- JONGJAREONRAK, A. et al. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 475–484, 2005.
- KITTIPHATTANABAWON, P. et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 363–372, 2005.
- KITTIPHATTANABAWON, P. et al. Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1519–1526, 2010.
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LI, H. et al. Studies on bullfrog skin collagen. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 65–69, 2004.
- LI, Z. R. et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 1, p. 103–113, 2013.
- LIU, D. et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1441–1448, 2012.

- LIU, H.; LI, D.; GUO, S. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 621–625, 2007.
- Liu, W., et al. Normobaric hyperoxia attenuates early blood–brain barrier disruption by inhibiting MMP-9-mediated occludin degradation in focal cerebral ischemia. **J. Neurochem.** v. 108, p. 811–820, 2009.
- MCCORMICK, R. J. Collagen. In *Applied muscle biology and meat science* (pp. 127–146). Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009.
- MILLER, E. J. Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. **Biochemistry**, v. 11, n. 26, p. 4903–9, 1972.
- MINH THUY, L. T.; OKAZAKI, E.; OSAKO, K. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. **Food Chemistry**, v. 149, p. 264–270, 2014.
- MONTERO, P.; JIMENEZ, COLMENERO, F.; BORDERAS, J. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, n. 1, p. 137–146, 1991.
- MORI, H. et al. Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabis saira*). **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 1, p. 174–181, 2013.
- NA, G. C. UV Spectroscopic Characterization of Type I Collagen. **Collagen and Related Research**, v. 8, n. 4, p. 315–330, 1988.
- NAGAI, T. et al. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu. **Food Chemistry**, v. 111, p. 296–301, 2008.
- NALINANON, S. et al. Tuna pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus* spp.). **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, 2008.
- OGAWA, M. et al. Biochemical Properties of Black Drum and Sheepshead Seabream Skin Collagen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 8088–8092, 2003.
- PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3737–3742, 2010.
- PAYNE, K. J.; VEIS, A. Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. **Biopolymers**, v. 27, n. 11, p. 1749–1760, 1988.
- RESENDE, S. M.; FERREIRA, B. P.; FREDOU, T. A pesca de lutjanídeos no Nordeste do Brasil: histórico das pescarias, características das espécies e relevância para o manejo. **Bol. Técn. Cient. CEPENE**, v. 11, n. 1, p. 257–270, 2003.

- ROCHDI, A.; FOUCAT, L.; RENO, J. P. NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen. **Food Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 295–299, 2000.
- RODZIEWICZ-MOTOWIDŁO, S. et al. Isolation and characterization of a thermally stable collagen preparation from the outer skin of the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. **Aquaculture**, v. 285, n. 1–4, p. 130–134, 2008.
- SATO, K. et al. Possible involvement of aminotelopeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with proteases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25870–25875, 2000.
- SENARATNE, et al. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 191–197, 2006.
- SHIGERU KIMURA, YUJI OMURA, M. I. AND H. S. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FIBRILLAR COLLAGEN FROM THE BODY WALL OF STARFISH *ASTERIAS AMURENSIS* SHIGERU. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. April, p. 3128–3133, 1993.
- SIKORSKI, Z. E.; SCOTT, D. N.; BUISSON, D. H. The role of collagen in the quality and processing of fish. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 20, n. 4, p. 301–343, 1984.
- SINGH, P. et al. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 97–105, 2011.
- SONG, E. et al. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. **Biomaterials**, v. 27, p. 2951 – 2961, 2006.
- SU, X. R. et al. Characterization of acid-soluble collagen from the coelomic wall of Sipunculida. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2190–2194, 2009.
- SUREWICZ, W.; MANTSCH, H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. **Biochimica et biophysica acta**, v. 952, n. 2, p. 115–130, 1988.
- VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). **Process Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 1592–1602, 2013.
- Vojdani, F. Solubility. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (1st ed.). (pp. 11 - 60) Great Britain: St Edmundsbury Press, 1996.
- YAN, M. et al. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1581–1586, 2008.
- ZENG, S. et al. Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1975–1984, 2012.
- ZHANG, J. et al. Isolation And Characterization Of Collagens From Scale Of Silver Carp (*Hypophthalmichthys Molitrix*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1343–1354, 2010.

ZHANG, Y. et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Chemistry**, v. 103, p. 906 – 912, 2007.

ZHOU, P.; REGENSTEIN, J. M. Comparison of water gel desserts from fish skin and pork gelatins using instrumental measurements. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 4, p. 196–201, 2007.

Legenda das figuras

Figure 1: Distribuição das bandas para ASC e PSC do colágeno extraído das escamas da cioba. Seguindo da esquerda para a direita temos as seguintes fileiras: 1º padrão com proteínas de alto peso molecular; 2º colágeno padrão bovino; 3º distribuição das bandas de ASC; 4º distribuição das bandas de PSC.

Figure 2: Solubilidade de ASC (vermelho) e PSC (preto) em 0,5M de ácido acético submetido a variações de pH.

Figure 3: Solubilidade de ASC (vermelho) e PSC (preto), solubilizado em 0,5M de ácido acético submetido a diferentes concentrações de NaCl.

Figure 4: Termograma do ASC (preto) e PSC (vermelho) reidratado em 0,5M de ácido acético.

Figure 5: Espectro FTIR para colágeno ASC obtido a partir das escamas da cioba.

Figure 6: Espectro FTIR para colágeno PSC obtido a partir das escamas da cioba.

Tabelas

Tabela 1: Espectro de absorção de raios ultravioleta do colágeno ácido solúvel e pepsino solúvel extraído das escamas da cioba.

Tabela 2: Conteúdo de aminoácidos presente na composição do colágeno pepsino solúvel extraído da cioba.

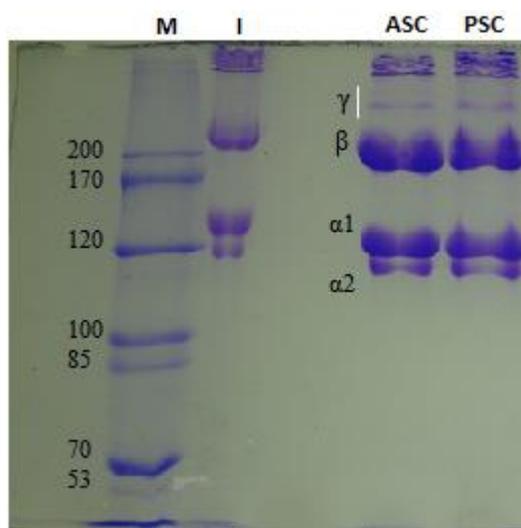


Figura 1

Extraction type/Species	<i>Lutjanus analis</i>
ASC	236nm
PSC	239nm

Tabela1

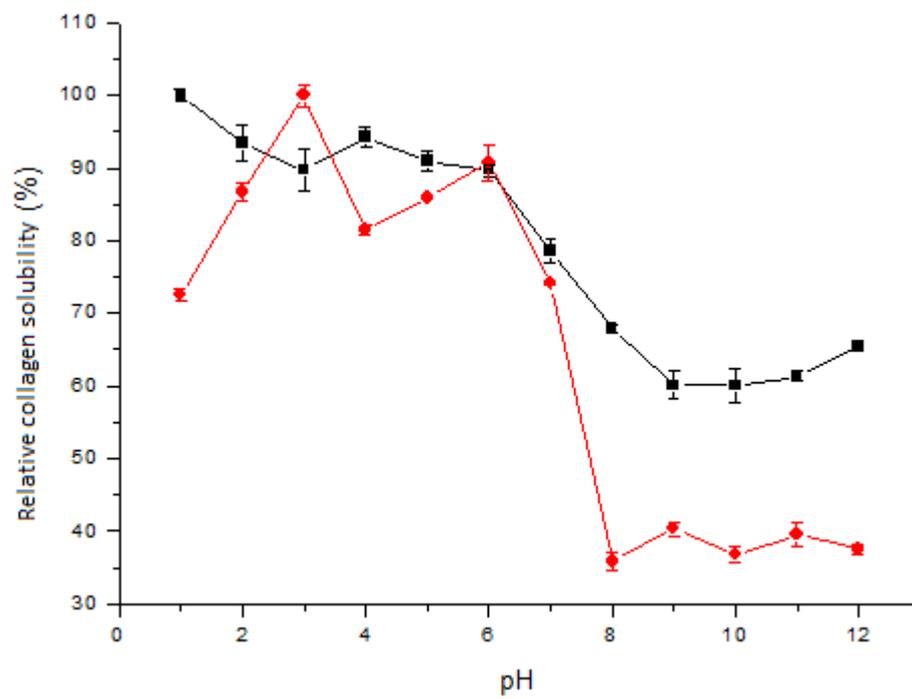


Figura 2

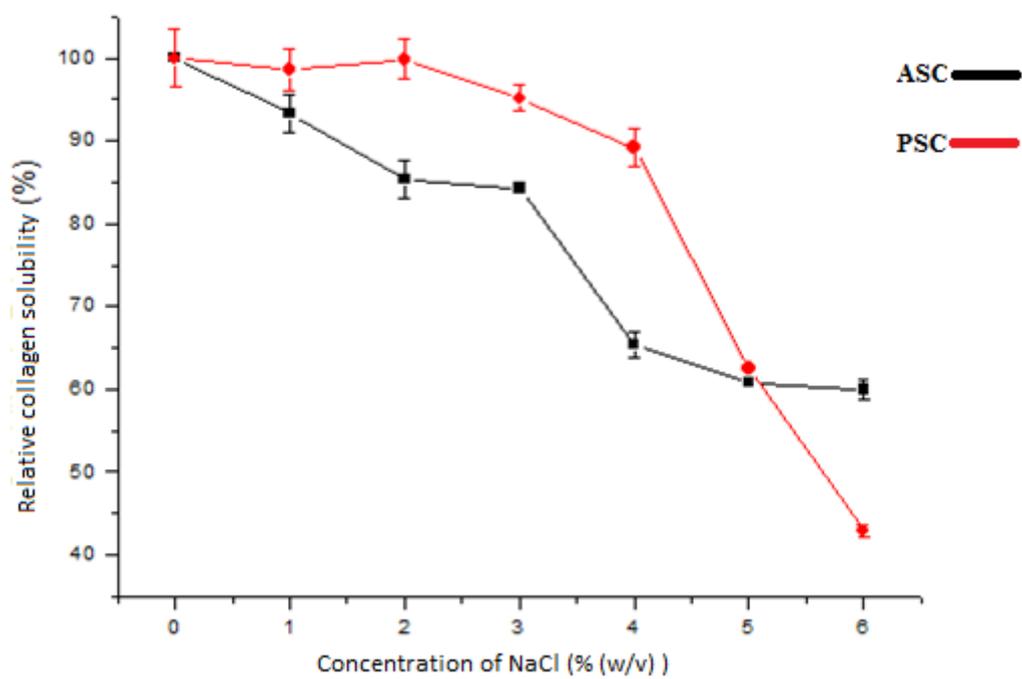


Figura 3

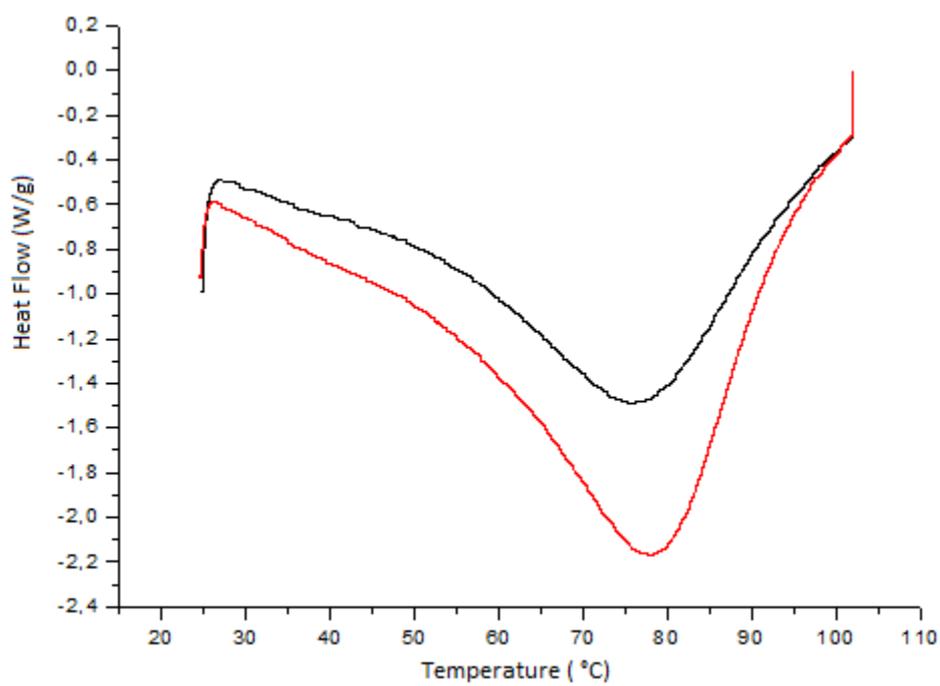


Figura 4

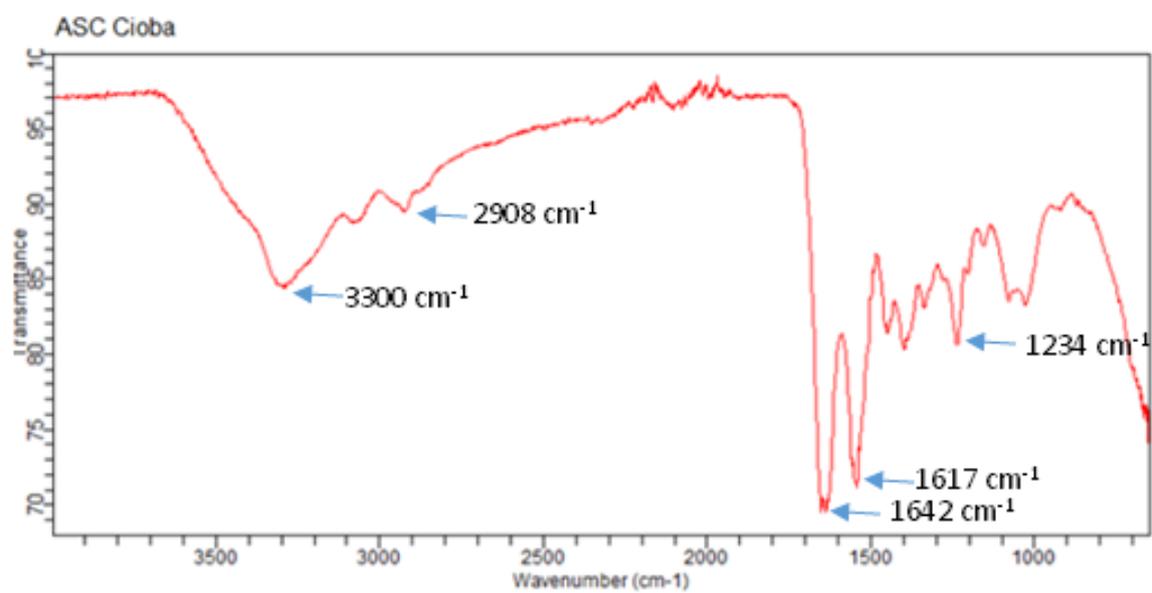


Figura 5

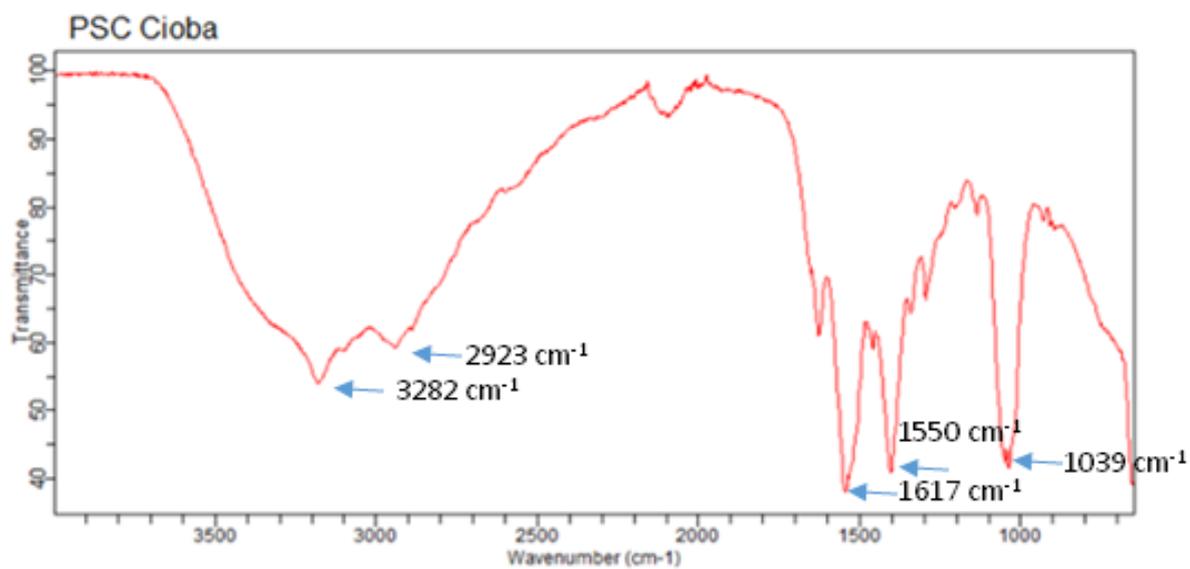
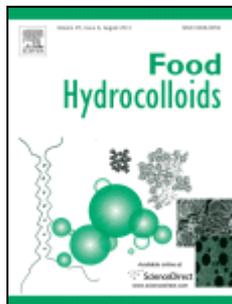


Figura 6

Amino acids	PSC
Aspartic acid	50.76
Glutamic acid	61.42
Hydroxyproline	87.85
Serine	32.26
Glycine	184.79
Histidine	46.41
Arginine	109.76
Threonine	34.3
Alanine	89.43
Proline	106.77
Tyrosine	56.28
Valine	1.98
Methionine	22.49
Cystine	16.63
Isoleucine	11.23
Leucine	22.83
Phenylalanine	26.2
Lysine	47.55
Total	1009
Imino acids	194.92

Tabela 2

**5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO A PARTIR
DAS ESCAMAS DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**



A ser submetido ao periódico

International Journal of Biological Macromolecules

Após a sua tradução para língua inglesa

(ISSN: 0268-005X)

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO A PARTIR
DAS ESCAMAS DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

Neri, R. C. A.; Costa, H. M. S.; Freitas JR., P. A.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO JR,
L. B.

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de
Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

Corresponding author:

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de
Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária,

50670-420, Recife-PE, Brazil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

email: ransoube@uol.com.br

RESUMO

O colágeno foi extraído a partir das escamas do *Colossoma macropomum*, peixe da bacia amazônica. Com rendimento calculado com base no peso seco a extração teve um aproveitamento total de 2,8% (p/v) sendo 1,6% da extração ácido solúvel (CAS) e 1,2% pepsino solúvel (CPS). A proteína isolada foi confirmada como colágeno tipo I por meio de experimentos e análises como SDS-PAGE, FTIR e absorção de raios UV. No padrão eletroforético as amostras de colágeno obtidas apresentaram duas diferentes cadeias α (α_1 e α_2), uma cadeia β e uma cadeia γ . Para a análise de FTIR ambas as amostras de colágeno apresentaram os picos de absorção para as amidas coincidindo, constatando que o processo de extração com a pepsina manteve a integridade da molécula. Tanto CAS como CPS apresentaram maior solubilidade em faixa ácida sendo que o pico de solubilidade para ambos ocorreu em pH 2,0. No ensaio para observar o efeito da concentração de NaCl sobre a solubilidade de CAS e CPS, os dois tipos de colágeno apresentaram comportamento similar tendo elevada solubilidade até uma concentração de 2% de NaCl. Estes resultados indicam que o colágeno obtido apresenta um alto nível de integridade da sua estrutura e pode ser aplicado como fonte alternativa ao colágeno de mamíferos.

Palavras Chave: Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Colágeno, Escamas, Bacia amazônica

1 INTRODUÇÃO

Se colocando entre as proteínas fibrosas mais abundantes o colágeno cumpre uma variedade de funções mecânicas e estruturais nos animais. Está presente na pele, artérias, cartilagens e na maior parte da matriz extracelular (Fratzl, 2008). Sua estrutura trata-se de uma tripla hélice com cadeias α de polipeptídeos ligados entre si e orientação dextrógiro (Senaratne, 2006). Atualmente são conhecidos 29 tipos de colágeno que se diferem nas sequências de aminoácidos, função e estrutura (Liu et al., 2012; Chen^a et al., 2016). Entre esses vários tipos de colágeno o tipo I é o mais abundante, sendo portanto o mais utilizado em alimentos, indústria de materiais biomédicos, produtos farmacêuticos e cosméticos (Sinthusamran et al., 2013).

Peles e ossos de animais terrestres como vacas e porcos são as fontes mais comuns de obtenção do colágeno, entretanto nos últimos anos a eclosão de doenças como encefalopatia espongiiforme bovina (EEB), encefalopatia espongiiforme transmissível (EET) e febre aftosa (FA) tem causado apreensão entre consumidores de produtos derivados de colágeno bovino. Juntando se a isso o fato de o colágeno de origem suína não poder ser usado como ingrediente de alguns alimentos por motivos religiosos (Li et al., 2013). Problemas como esses limitam o consumo de colágeno e fazem com que fontes alternativas e seguras sejam encontradas (Huang et al., 2011).

Os subprodutos da indústria pesqueira provenientes de peixes e outros animais marinhos podem ser fontes ricas em colágeno devido a sua disponibilidade e alto rendimento. (Sinthusamran et al., 2013; Pal & Suresh, 2016). Esses subprodutos (peles, escamas, barbatanas e ossos) representam cerca de 20% a 75% do peso total dos peixes (Pal & Suresh, 2016; Ferraro et al., 2013). As escamas têm potencial como fonte alternativa ao colágeno extraído de mamíferos. Desta forma, a extração não só aumentaria o valor agregado destes produtos como também reduziria o impacto ambiental causado por seu despejo no meio ambiente (Chen^b et al., 2016).

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) é um peixe Characiforme nativo da bacia amazônica e de grande importância comercial para o Brasil (Batisa & Petreire, 2003). Em 2015 foram produzidas 135.858 toneladas (IBGE, 2015). Este trabalho

teve como objetivo extrair, isolar e caracterizar o colágeno ácido solúvel (CAS) e pepsino solúvel (CPS) obtido a partir das escamas do Tambaqui (*C. macropomum*).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

As escamas do peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram obtidas a partir da indústria pesqueira local. Após a coleta, o material foi lavado com água destilada e armazenado a -20°C para posterior utilização.

2.2 EXTRAÇÃO DO COLÁGENO A PARTIR DAS ESCAMAS

A extração do colágeno a partir das escamas realizou-se em duas etapas sequenciais. Na primeira etapa, as escamas do peixe foram desmineralizadas com EDTA e após isso fez-se a remoção de outras proteínas como o uso de NaOH. Na segunda, o colágeno foi isolado através do tratamento com ácido acético. Ambas as etapas ocorrerão a 4°C com homogeneização constante (Fruchour & Koenig, 1975).

As escamas desmineralizadas foram tratadas com ácido acético 0,5M, pH 2,5 por um período de 72 horas. O material obtido foi precipitado utilizando tampão Carbonato-Bicarbonato de sódio pH 10,0 combinado com NaCl 0,9M durante 1h, seguido por centrifugação a 20000 G por 35 minutos à 4°C. As etapas de precipitação e centrifugação repetiram-se por 3 vezes. O precipitado foi novamente solubilizado em ácido acético 0,5M, dialisado em ácido acético 0,1M, água destilada e por fim liofilizado (Fruchour e Koenig, 1975). Obtido-se o colágeno ácido solúvel (CAS).

O colágeno pepsino solúvel foi obtido pela incubação do material insolúvel obtido nas etapas anteriores com pepsina comercial (EC 3.4.23.1; cristalizada e liofilizada, Sigma, MO) na proporção de 1:20 (p/v) com homogeneização constante por 24h à 4°C, seguido pelo processo de precipitação descrito anteriormente, a amostra obtida foi denominada de colágeno pepsino solúvel (CPS).

2.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) seguiu o protocolo estabelecido por Laemmli (1970) usando tampão Tris-HCl /glicina, e gel de corrida a 7,5% e gel de concentração a 4%. Para a detecção das bandas protéicas utilizou-se o corante Azul de Coomassie. O gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (0,5% p/v), metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) e em seguida, descorado com ácido acético 10% (v/v).

2.4 ESPECTRO ULTRAVIOLETA

Os espectros de absorção de raios ultravioleta de CAS e CPS foram medidos em um espectrofotômetro Bio-Rad. Amostras de colágeno foram dissolvidas em ácido acético 0,5 M até se obter soluções com concentração de 1mg/ml. Por fim as soluções foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e a absorção na faixa do ultravioleta se deu em comprimentos variando entre 200-600 nm (Zeng et al., 2012).

2.5 ESPECTROSCOPIA FTIR

Os espectros infra-vermelho de colagénio de *Colossoma macropomum* foram registados utilizando um espectrofotómetro FTIR Genesis II (Mattson, EUA) equipado com um dispositivo ATR (MIRacle™ PIKE Technologies) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Todos os espectros foram registados em modo de absorção a intervalos de 4 cm⁻¹ e 64 scans (Sionkowska et al., 2015).

2.6 PARÂMETROS DE SOLUBILIDADE

A solubilidade das amostras de colágeno ácido solúvel (CAS) e pepsino solúvel (CPS) foi determinada seguindo a metodologia de Montero et al. (1991). As amostras obtidas foram dissolvidas em ácido acético 0,5M para a obtenção de uma solução final com concentração de 3mg/ml. A mistura foi agitada a 4°C por 24 horas, seguido por centrifugação a 5000xg durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para estudos de solubilidade descritos abaixo.

2.6.1 Efeito do pH na Solubilidade

O efeito do pH sobre a solubilidade do CAS e CPS foi avaliado segundo Montero et al., (1991) com modificações. As amostras obtidas (3mg/ml, 1mL) foram incubadas em soluções de água deionizada com pH ajustado pelo uso de HCl 6M ou NaOH 6M objetivando-se obter soluções com pH final variando entre 1-10, seguido de centrifugação a 20000xg durante 30 minutos a 4°C.

2.6.2 Efeito do NaCl na Solubilidade

O efeito do NaCl sobre a solubilidade do CAS e CPS foi avaliado segundo Singh et al. (2011). As amostras obtidas (6mg/mL, 5mL) foram incubados com 5mL de NaCl em ácido acético 0,5M em diferentes concentrações (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6% v/v), seguido de centrifugação a 20.000xg por 30 minutos a 4°C.

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos de dosagem foram realizados em triplicata e expressos em média±desvio padrão.As análises foram feitas utilizando o programa estatísticoMicroCal® Origin® Version 8.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE COLÁGENO CAS E CPS

O rendimento total de colágeno extraído a partir das escamas do tambaqui foi de 2,8% do peso seco, sendo 1,60% de CAS e 1,20% de CPS. Esse resultado mostra que o colágeno presente nas escamas, assim como em outros tecidos, não é completamente solubilizado em ácido acético 0,5M. Isso se deve a presença de ligações covalentes

cruzadas responsáveis pela condensação de grupos aldeído nas regiões telopeptídicas que são responsáveis pela diminuição da solubilidade do colágeno em soluções ácidas (Foegeding et al., 1996, Zhang et al., 2007). Em um processo digestivo com a presença da pepsina as ligações cruzadas presentes na região telopeptídica foram clivadas sem danificar a integridade da tripla hélice como observado nas extrações com *Doryteuthis singhalensis* (Veeruraj et al., 2015).

Resultados similares foram encontrados para os seguintes trabalhos: *Hypophthalmichthys molitrix* (3,18%) (Zhang et al., 2010), *Sciaenops ocellatus* (4,93%) (Chen^a et al., 2016), *Oreochromis niloticus* (3,2%) (Chen^b et al., 2016) e *Brama australis* (1,5%) (Sionkowska et al., 2015). Fatores como diferentes condições biológicas, a que cada espécie está submetida, condições e métodos de extração e grau de reticulação das moléculas da região telopeptídica provocarão variações no rendimento (McCormick, 2009; Regenstein & Zhou, 2007; Foegeding et al., 1996).

3.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Os padrões de colágeno CAS e CPS como mostra a figura 1 apresentaram uma distribuição de bandas similar a encontrada no colágeno bovino e demais espécies de peixes (Li et al., 2013; Bhagwat & Dandge, 2016; Sionkowska et al., 2015; Chen et al., 2016^b) mostrando que o colágeno extraído das escamas do tambaqui trata-se provavelmente do tipo I. na região entre 100 e 120 KDa estão duas bandas α (α_1 e α_2) (Foegeding et al., 1996) e na região de 200 KDa podemos encontrar as bandas β e γ . Na coluna em que ocorreu a corrida para o CAS vê-se que α_1 é proporcionalmente mais denso que α_2 e que há a presença de quantidades significativas de ligações cruzadas, fato esse evidenciado pela diferença de intensidade das bandas β de CAS e CPS respectivamente (Sato et al., 2000). Isso pode explicar a dificuldade em solubilizar o colágeno em solução ácida, sendo necessária a complementação do processo com o uso da pepsina, pois a mesma atua clivando as ligações transversais contidas nas regiões telopeptídicas das cadeias β (Miller, 1972).

3.3 ESPECTRO ULTRAVIOLETA

A tabela 1 mostram que tanto o colágeno CAS e CPS possuem maior taxa de absorvência dos raios ultravioleta na faixa de 232 e 233 nm respectivamente, resultado semelhante ao encontrado para *Sciaenops ocellatus* (Chen et al., 2016), *Evenchelys macrura* (Veeruraj et al., 2013), *Esox lucius* (Kozłowska et al., 2015) e *Doryteuthis singhalensis* (Veeruraj et al., 2015). Em um espectro que compreende a região ultravioleta proteínas absorvem comprimentos de onda de até 280 nm no máximo (Duan et al., 2009). Fato não observado no colágeno devido aos baixos índices de tirosina, fenilalanina e triptofano. Aminoácidos cromóforos que absorvem os raios ultravioleta em uma faixa entre 240 e 280 nm (Liu & Liu, 2006). Pode-se dizer que o material extraído neste trabalho em ambas as extrações é colágeno do tipo I com baixos níveis de agentes contaminantes.

3.4 SOLUBILIDADE DO COLÁGENO

3.4.1 Efeito do pH

Tanto CAS quanto CPS apresentaram maior solubilidade em faixas de pH ácido, tendo pequenas variações de solubilidade ao longo da faixa como mostra a figura 2. O pico de solubilidade ocorreu em pH 2,0 para ambos os tipos de colágeno e há uma acentuada perda de solubilidade de ambas as amostras a partir do pH 7,0 (faixa neutra), alcançando seu valor mínimo em pH 9,0 e 8,0, para CAS e CPS respectivamente. Essas diferenças na solubilidade mediante variações no pH podem ser atribuídas a formas diferentes de conformação do colágeno (Kittiphattanabawon et al., 2005), assim como também quando o pH do meio em que se encontra o colágeno atinge um valor próximo ou igual ao ponto isoelétrico (pI) há uma redução na solubilidade causada pelo fato de a soma das cargas positivas e negativas ser igual a zero tendo como resultado a precipitação e agregação da molécula devido ao aumento das interações hidrofóbicas (Vojdani, 1996). Foegeding et al., (1996) verificaram que o pI do colágeno varia numa faixa entre 6-9. Nos seguintes trabalhos o colágeno apresentou comportamento similar: Li et al., 2013; Veeruraj et al., 2013; Jeevithan et al., 2014; Di et al., 2014.

3.4.2 Efeito da Concentração de NaCl

Na figura 3 observa-se o efeito da concentração de NaCl sobre a solubilidade de CAS e CPS. Ambos os tipos de colágeno apresentaram padrão similar com diferenças sutis ao longo da variação da concentração de NaCl nos intervalos de 0% a 6% (p/v). A solubilidade de CAS e CPS se mantiveram elevadas até uma concentração de 2% de NaCl (p/v) e apresentaram forte queda entre 3% e 4% respectivamente. Após isso a solubilidade de CAS continuou a cair em um menor ritmo e a de CPS se estabilizou na faixa entre 5% e 6%. Resultados similares foram encontrados para *Katsuwonus pelamis* (Di et al., 2014); *Carcharhinus albimarginatus* (Jeevithan et al., 2014); *Evenchelys macrura* (Veeruraj et al., 2013). A diminuição da solubilidade do colágeno se dá devido ao efeito de “salting out” que ocorre em concentrações elevadas de NaCl. Uma vez no meio sais iônicos competirão pela água com as proteínas, como esses possuem uma maior força iônica terão como efeito a redução da solubilidade do colágeno que por sua vez aumentará as interações hidrofóbicas entre suas cadeias tendo como consequência a sua precipitação (Bae et al., 2008; Jongjareonrak et al., 2005; Di et al., 2014). Apesar de terem apresentado curvas de tendência similares, o PSC foi menos susceptível as variações da concentração de NaCl, provavelmente isso se deu devido a hidrólise parcial de moléculas reticuladas de alto peso molecular por ação da pepsina (Jongjareonrak et al., 2005; Di et al., 2014).

3.5 ANÁLISE FTIR

Os espectros FTIR de CAS e CPS obtidos do colágeno das escamas de tambaqui são representados na figura 4 e 5. As bandas de absorção de amida apresentam-se distribuídas ao longo do espectro tanto para o CAS como para o CPS. O padrão apresentado mostra bandas típicas para o colágeno tipo I: Amida A, Amida B, Amida I, Amida II e Amida III. Normalmente associadas a vibração de estiramento de ligações N-H, que ocorre na faixa entre 3400 cm^{-1} e 3340 cm^{-1} , o pico para a Amida A ocorreu em 3300 cm^{-1} para ambos os tipos de colágeno, provavelmente devido ao envolvimento do grupo NH do peptídeo em ligações com o hidrogênio (Li et al., 2004; Pati et al., 2010). Para a Amida B o pico foi encontrado em 2909 cm^{-1} para ambos os tipos de colágeno, representando o alongamento assimétrico de CH_2 (Muyonga et al., 2004). Para a Amida I o pico máximo normalmente está localizado na faixa entre 1600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} e está associado a vibração de alongamento de grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) ao longo do esqueleto

polipeptídico, que indica a presença de estruturas secundárias (Payne & Veis, 1988). Esta Amida apresentou absorção máxima em 1623 cm^{-1} tanto para o CAS como para o CPS, resultado similar ao encontrado para *Brama australis* (Sionwkoska et al., 2015), *Cyprinus carpio* (Prashant & Dandge, 2016) e *Istiophorus platypterus* (Tamilmozhi et al., 2013). As ondas de vibração da Amida II apresentaram absorção máxima em 1530 cm^{-1} e são atribuídas a flexões no plano das ligações NH e alongamentos do CN (Zanaboni et al., 2000). O pico para a Amida III também apresentou o mesmo resultado para ambos os colágenos extraídos, 1211 cm^{-1} . Este ponto trata-se de uma complexa região em que são encontrados alongamentos de CH e NH em flexão plana a partir de ligações amida em que o colágeno sofre a interferência de interações intermoleculares bem como absorções resultantes do movimento de grupos CH_2 a partir do esqueleto de glicina e cadeias laterais de prolina (Plepis et al., 1996). Devido à similaridade apresentada na amplitude dos espectros pode-se dizer que o colágeno manteve sua integridade estrutural mediante os processos de extração. No entanto sutis diferenças podem existir entre CAS e CPS devido a ação da pepsina.

6 CONCLUSÃO

Foi possível extrair e isolar o colágeno ácido solúvel (CAS) e pepsino solúvel (CPS) a partir das escamas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) obtendo-se um rendimento de 1,6% para o ASC e 1,2% para o PSC. Com análises como SDS-PAGE, Espectro Ultravioleta, FTIR e a dosagem de hidroxiprolina confirmou-se que o colágeno extraído trata-se do tipo I. As amostras de ASC e PSC se mostraram susceptíveis a perda de solubilidade mediante variações no pH, tendendo para faixas alcalinas, e aumentos nas concentrações de NaCl. Esses resultados mostram que o colágeno obtido a partir das escamas do Tambaqui (*C. macropomum*) tem um elevado teor de pureza assim como também uma considerável importância comercial podendo ser utilizado futuramente na obtenção de diversos biomateriais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALINA SIONKOWSKA, et al. Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. **International Journal of Biological Macromolecules**. V 80. p 605-609,2015.

BAE, I. et al. Food Chemistry Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. v. 108, p. 49–54, 2008.

BATISTA, V. DA S.; PETRERE JR., M. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 1, p. 53–66, 2003.

BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 234–240, 2016.

BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 234–240, 2016.

CHEN^a, J. et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 453–459, 2016.

CHEN^b, S. et al. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 468–477, 2016.

FOEGEDING, E.A., et al. Characteristics of edible muscle tissues.1996.

FRATZL P. Collagen: structure and mechanics, an introduction. In: Fratzl P (ed) Collagen. Springer, Berlin, pp 1–13. 2008.

FRUSHOUR, B. G.; KOENIG, J. L. Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. **Biopolymers**, v. 14, n. 2, p. 379–391, 1975.

HIDEKI MORI, et al. Studies on fish scale collagen of Pacific saury (*Cololabis saira*) **Materials Science and Engineering C**. p 1-8.

HUANG, Y. R. et al. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1507–1513, 2011.

In: Fennema, O.R. (Ed.), Food Chemistry. Marcel Dekker, New York, pp. 879–942.

- JEEVITHAN, E. et al. Isolation , purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1767–1777, 2014.
- JONGJAREONRAK, A. et al. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 475–484, 2005.
- KITTIPHATTANABAWON, P.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Food Chemistry Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). v. 89, p. 363–372, 2005.
- KOZLOWSKA, J. et al. Northern pike (*Esox lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 220–227, 2015.
- L.S. SENARATNE, et al. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresour. Technol.**, 97, pp. 191–197, 2006.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LI, B., KENNEDY, et al. Quick dissolvable, edible and heatsealable blend films based on konjac glucomannane gelatin. **Food Research International**, 39(5), 544e549.2006.
- LI, Z. R. et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 1, p. 103–113, 2013.
- LIU, D. et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1441–1448, 2012.
- LIU, Y. K., & LIU, D. C. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry*, 99, 244–251, 2006.
- MARIA, A. N. A. et al. Dielectric and Pyroelectric Characterization of Anionic and Native Collagen. **2932 Polymer Engineering And Science**, v. 3, n. 24, p. 3–9, 1996.
- MCCORMICK, R. J. Collagen. In *Applied muscle biology and meat science* (p. 127-146). Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009.
- Miller, E. J. (1972). Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. **Biochemistry**, 11, 4903–4909.

MONTERO, P., et al. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, p. 137–46, 1991.

MUYONGA, J. H., et al. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, 85 (1), 81-89, 2004.

PAL, G. K.; SURESH, P. V. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2015.

PATI, F., et al. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**, 101, 3737 – 3742, 2010.

PAYNE, K. J.; VEIS, A. Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. **Biopolymers**, v. 27, n. 11, p. 1749–1760, 1988.

REGENSTEIN, J. M., & ZHOU, P. Collagen and gelatin from marine by-product. In F. SHAHIDI 423 (Ed.), *Maximising the value of marine by-products* (p. 279–303). Boca Raton, Florida:424 CRC Press, 2007.

SATO, K., et al. Possible involvement of aminotelopeptide in self-assembly and thermal stability of collagen I as revealed by its removal with protease. **Journal of Biological Chemistry**, 275, 25870–25875, 2000.

SINTHUSAMRAN, S., et al. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). **Food Chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2435–2441, 2013.

TAI, D. W. *De Geografia E Estatística - IBGE*. [s.d.].

TAMILMOZHI, S.; VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1499–1505, 2013.

V. FERRARO, et al. Pintado Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues - a review. **Mater. Sci. Eng. C**, 33, pp. 3111–3120, 2013.

VEERURAJ, A. et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 708e716, 2015.

- VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). **Process Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 1592–1602, 2013.
- VOJDANI, F. Solubility. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (1st ed.). (pp. 11 - 60) Great Britain: St Edmundsbury Press. 1996.
- YU, D. et al. Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 9, p. 712–720, 2014.
- ZANABONI, G. et al. Stability and networks of hydrogen bonds of the collagen triple helical structure: Influence of pH and chaotropic nature of three anions. **Matrix Biology**, v. 19, n. 6, p. 511–520, 2000.
- ZENG, et al. Isolation and characterization of acid-solubilized collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v. 116, p.879-883, 2009.
- ZHANG, J. et al. Isolation And Characterization Of Collagens From Scale Of Silver Carp (*Hypophthalmichthys Molitrix*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1343–1354, 2010.
- ZHANG, M.; LIU, W.; LI, G. Isolation and characterisation of collagens from the skin of largescale longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chemistry*, v. 115, p. 826-831, 2009.

Legenda das Figuras

Figura 1: Distribuição das bandas para ASC e PSC extraídos das escamas de Tambaqui. Da direita para a esquerda temos as seguintes fileiras: 1° Padrão com proteínas de alto peso molecular; 2° Padrão ASC; 3° Padrão PSC.

Figura 2: Solubilidade do ASC e PSC em 0,5M de ácido acético submetido a variações de pH.

Figura 3: Solubilidade de ASC e PSC em 0,5M de ácido acético submetido a diferentes concentrações de NaCl.

Figura 4: Espectro FTIR para colágeno obtido a partir das escamas do tambaqui

Figura 5: Espectro FTIR para colágeno obtido a partir das escamas do tambaqui

Tabela 1: Picos de absorção de raios ultravioleta.

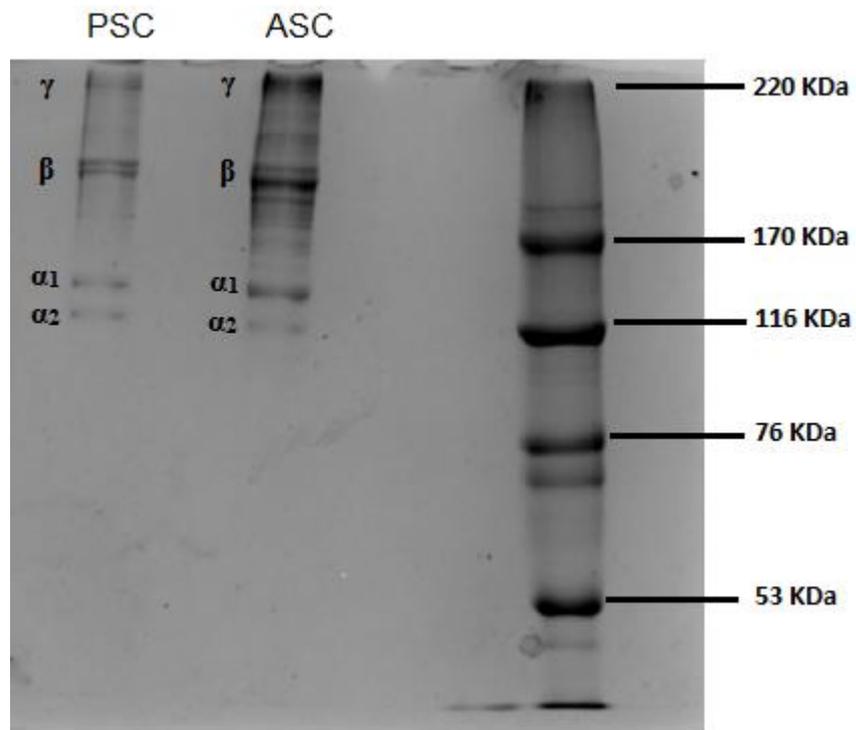


Figura 1

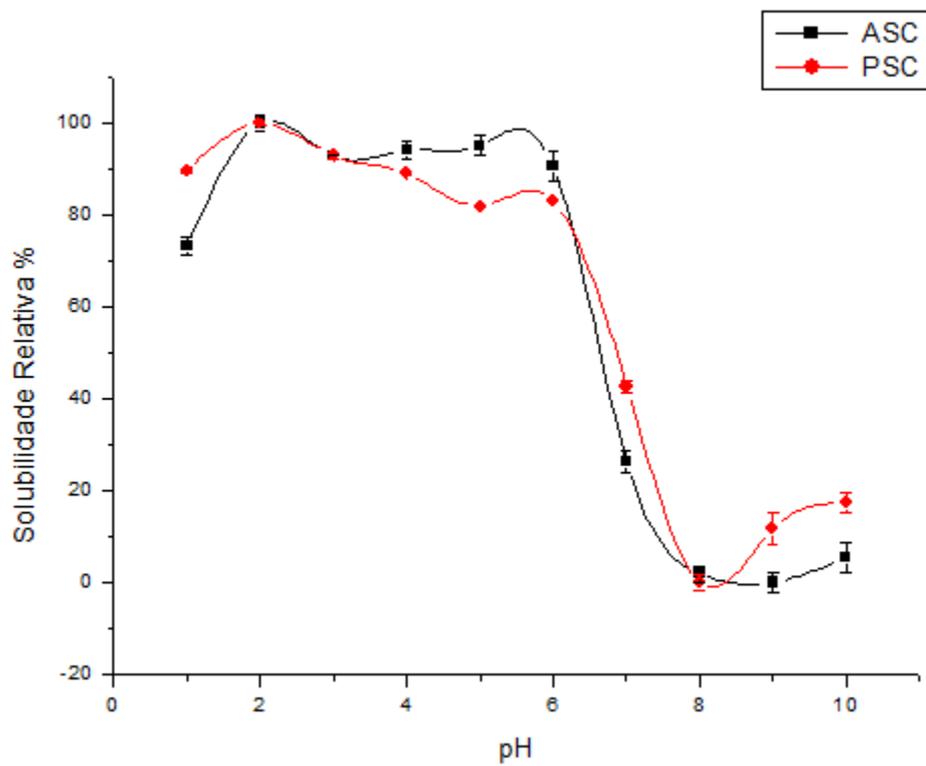


Figura 2

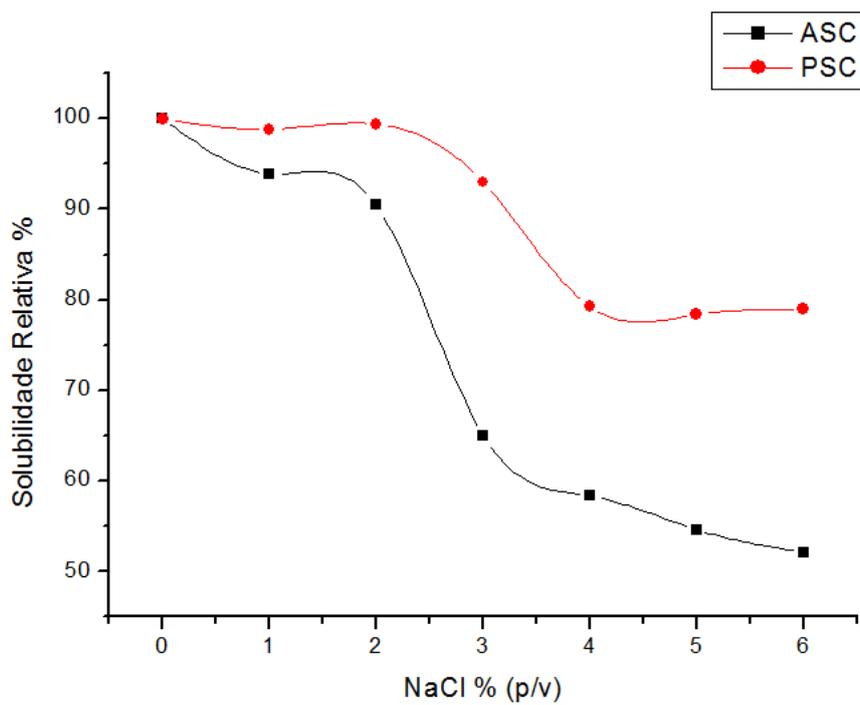


Figura 3

TIPO DE COLÁGENO/ESPÉCIE	<i>Colossoma macropomum</i>
ASC	232nm
PSC	233nm

Tabela 1

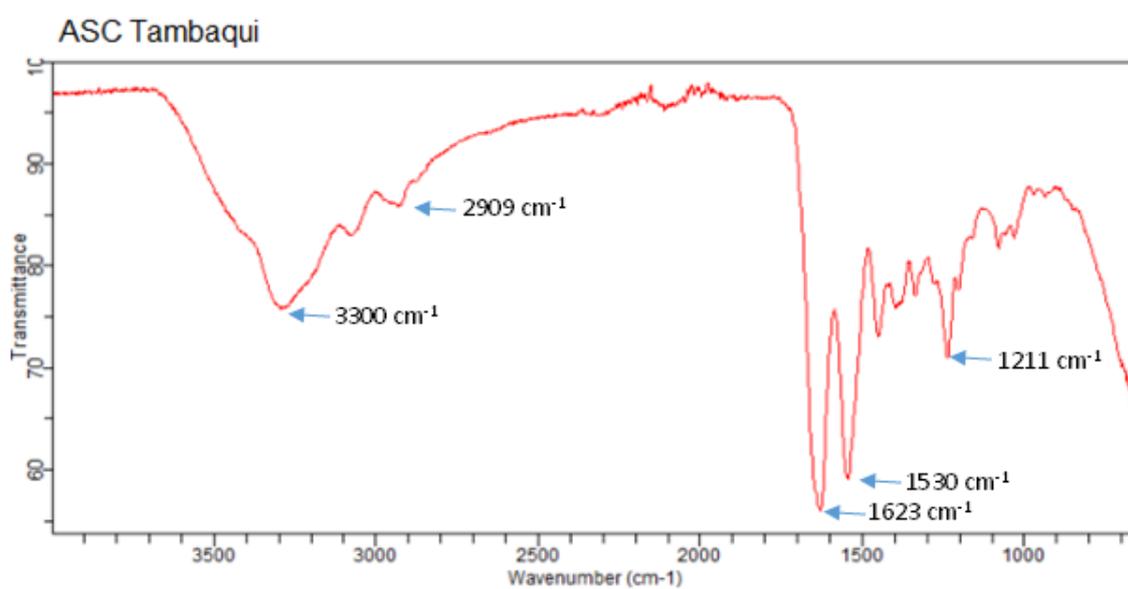


Figura 4

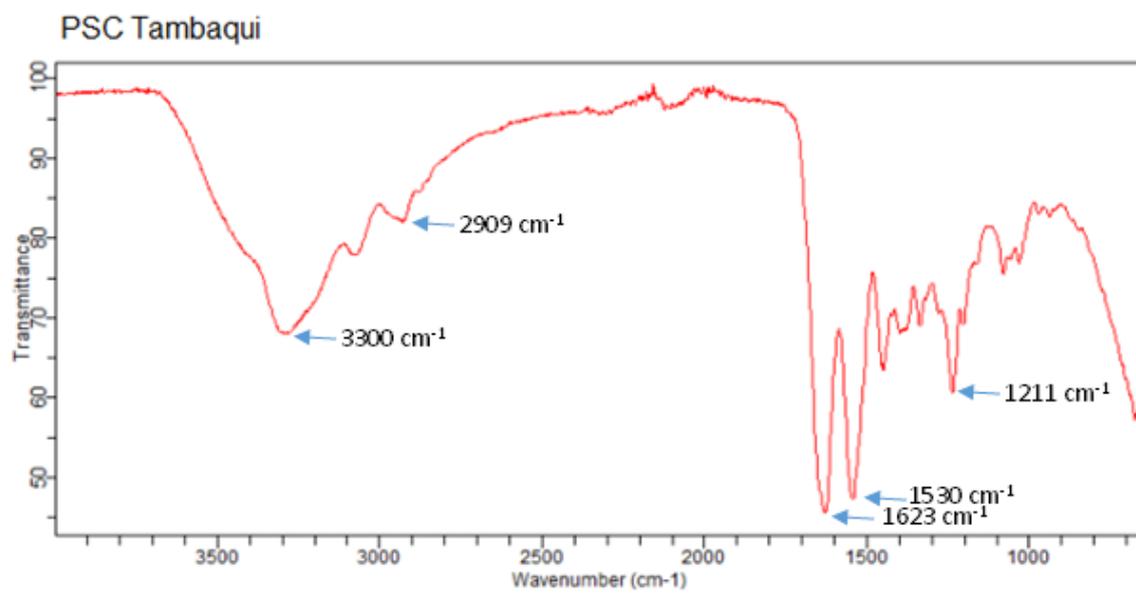
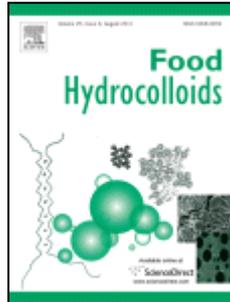


Figura 5

**6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO A PARTIR
DA PELE DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)**



A ser submetido ao periódico

Após tradução para o inglês

International Journal of Biological Macromolecules

(ISSN: 0268-005X)

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO OBTIDO A PARTIR
DA PELE DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)**

Neri, R. C. A.; Costa, H. M. S.; Freitas JR., P. A.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO JR,
L. B.

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de
Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

Corresponding author:

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de
Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária,

50670-420, Recife-PE, Brazil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

email: ransoube@uol.com.br

RESUMO

O colágeno foi extraído a partir da pele da corvina (*Micropogonias furnieri*), espécie costeira, está entre as mais importantes do Atlântico Sudoeste. Com rendimento calculado com base no peso seco a extração teve um aproveitamento total de 66,71% (p/v) sendo 22,46% da extração ácido solúvel (CAS) e 44,25% pepsino solúvel (CPS). A proteína isolada foi confirmada como colágeno tipo I por meio de experimentos e análises como SDS-PAGE, FTIR e absorção de raios UV. No padrão eletroforético as amostras de colágeno obtidas apresentaram duas diferentes cadeias α (α_1 e α_2), uma cadeia β e uma cadeia γ . Para a análise de FTIR ambas as amostras de colágeno apresentaram os picos de absorção para as amidas coincidindo, constatando que o processo de extração com a pepsina manteve a integridade da molécula. Tanto CAS como CPS apresentaram maior solubilidade em faixa ácida sendo que o pico de solubilidade para ambos ocorreu em pH 1,0. No ensaio para observar o efeito da concentração de NaCl sobre a solubilidade de CAS e CPS, os dois tipos de colágeno apresentaram comportamento similar tendo elevada solubilidade até uma concentração de 2% de NaCl. Estes resultados indicam que o colágeno obtido apresenta um alto rendimento de extração assim como também um elevado nível de integridade da sua estrutura e pode ser aplicado como fonte alternativa ao colágeno de mamíferos.

Palavras Chave: Corvina (*Micropogonias furnieri*), Colágeno, Pele, Atlântico

1 INTRODUÇÃO

Principal proteína fibrosa presente nos tecidos animais, o colágeno compõe cerca de 30% do conteúdo proteico dos organismos do reino animal (Pati et al., 2010). Tendo atualmente cerca de 29 formas conhecidas que ocorrem em diferentes tecidos, possuem sequências próprias de aminoácidos e estruturas moleculares distintas. O colágeno tipo I se destaca como a forma mais abundante, sendo portanto o mais utilizado nas indústrias alimentar, de materiais biomédicos, farmacêutica e cosméticos (Liu et al., 2012; Sinthusamran et al., 2013).

Sua estrutura trata-se de uma tripla hélice constituída de três cadeias polipeptídicas ligadas entre si e com a presença do motivo (Glicina-X-Y)_n que se repete ao longo das cadeias e é comum a todos os 29 tipos de colágeno. As posições X e Y são ocupadas por prolina e hidroxiprolina (Huang et al., 2016; McCormick, 2009).

Usualmente a fonte mais comum de colágeno tipo I são a pele e os ossos de animais terrestres como vacas, porcos e galinhas. Mas recentemente devido a um número cada vez maior de casos de doenças como gripe aviária, mal da vaca louca, febre aftosa e encefalopatia espongiforme bovina, a extração de colágeno a partir desses animais representa um risco crescente como via de transmissão de doenças (Chen et al., 2016; Jongiareonrak et al., 2005; Fernandez-Diaz et al., 2001; Ahmad & Benjakul, 2010). Juntando-se a isso o fato de que em religiões como o Hinduísmo, Judaísmo e Islamismo há restrições religiosas para o consumo de matéria orgânica de origem bovina e suína (Ahmad & Benjakul, 2010).

Nesse contexto fontes alternativas e que garantam uma maior segurança são de importância crucial. Os resíduos da indústria pesqueira, pele, ossos, escamas e bexiga natatória têm se destacado no mundo inteiro, pois os resíduos da filetagem podem representar até 75% do peso total do animal e além disso esses resíduos são causadores de poluição ambiental. Consequentemente a extração do colágeno a partir dos subprodutos de animais aquáticos satisfazem os consumidores, elevam os retornos econômicos da indústria pesqueira e aceleram o desenvolvimento da indústria de processamento de frutos do mar (Huang et al., 2016; Chen et al., 2016; Ahmad & Benjakul, 2010).

Nos últimos anos têm se publicado vários trabalhos relatando a extração e caracterização do colágeno a partir da pele de peixes como *Scomberomorous niphonius* (Li et al., 2013), *Hypophthalmichthys nobilis* (Liu et al., 2012), *Ctenopharyngodon idella* (Liu et al., 2015) e *Oreochromis niloticus* (Chen et al., 2016). A corvina (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823) (perciformes: Sciaenidae) é uma espécie de peixe que se distribui desde a costa do sul do Caribe até a costa atlântica da América do Sul. Encontrado geralmente sobre o barro arenoso de águas costeiras até 60 metros de profundidade. Possui uma grande importância alimentar sendo que em 2014 foram capturadas cerca de 106.236 toneladas no mundo todo (FAO 2017).

O presente trabalho tem como objetivo extrair e caracterizar o colágeno tipo I da pele da Corvina, *M. furnieri*, obtido a partir de extrações ácidas (CAS) e com uso de pepsina (CPS), assim como também sugerir o seu uso como fonte alternativa ao colágeno de animais terrestres.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

Os exemplares de pele de corvina (*Micropogonias furnieri*) foram obtidos a partir da indústria pesqueira local. Após a coleta, o material foi lavado com água destilada e armazenado a -20°C para posterior utilização.

2.2 EXTRAÇÃO DO COLÁGENO DA PELE

A extração do colágeno da pele realizou-se em duas etapas sequenciais. Na primeira etapa, a pele do peixe foi tratada com NaOH a 0,5M (proporção de 1:10 p/v) para a remoção de proteínas solúveis durante 12h; após esse processo lavou-se a pele com uma solução de HCl 0,5M para se obter um pH neutro; a gordura foi extraída da pele com uma solução a 10% de álcool butílico durante 24h, após isso o material mais uma vez foi lavado com água; uma solução a 3% de peróxido de oxigênio foi utilizada para a remoção de pigmentos e gorduras residuais. Na segunda etapa, o colágeno foi isolado através do

tratamento com ácido acético. Ambas as etapas ocorrerão a 4°C com homogeneização constante (Fruchour & Koenig, 1975).

A pele foi tratada com ácido acético 0,5M, pH 2,5, por um período de 72 horas. O material obtido foi precipitado utilizando uma solução salina de tampão Carbonato-Bicarbonato de Sódio 0,9M NaCl 0,9M durante 1h, seguido de centrifugação a 20000 G por 30 minutos à 4°C. As etapas de precipitação e centrifugação repetiram-se por 3 vezes. O precipitado foi novamente solubilizado em ácido acético 0,5M, dialisado em ácido acético 0,1M, água destilada e por fim liofilizado (Fruchour e Koenig, 1975). Obteve-se o colágeno ácido solúvel (CAS).

O colágeno pepsino solúvel foi obtido pela incubação do material insolúvel obtido nas etapas anteriores com pepsina comercial (EC 3.4.23.1; cristalizada e liofilizada, Sigma, MO) na proporção de 1:20 (p/v) com homogeneização constante por 24h à 4°C, seguido pelo processo de precipitação descrito anteriormente, denominando-se a amostra obtida como colágeno pepsino solúvel (CPS).

2.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) seguiu o protocolo estabelecido por Laemmli (1970) usando tampão Tris-HCl/glicina, e gel de corrida a 10% e gel de concentração a 4%. Para a detecção das bandas protéicas utilizou-se o corante Azul de Coomassie. O gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (0,5% p/v), metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) e em seguida, descorado com ácido acético 10% (v/v).

2.4 ESPECTRO ULTRAVIOLETA

Os espectros de absorção de raios ultravioleta de CAS e CPS foram medidos em um espectrofotômetro Bio-Rad. Amostras de colágeno foram dissolvidas em ácido acético 0,5 M até se obter soluções com concentração de 1mg/ml. Por fim as soluções foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e a absorção na faixa do ultravioleta se deu em comprimentos variando entre 200-600 nm (Zeng et al., 2012).

2.5 ESPECTROSCOPIA FTIR

Os espectros de infra-vermelhos de colagénio de *Micropogonias furnieri* foram registados utilizando um espectrofotómetro FTIR Genesis II (Mattson, EUA) equipado com um dispositivo ATR (MIRacle™ PIKE Technologies) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Todos os espectros foram registados em modo de absorção a intervalos de 4 cm⁻¹ e 64 scans (Sionkowska et al., 2015).

2.6 PARÂMETROS DE SOLUBILIDADE

A solubilidade das amostras de colágeno ácido solúvel (CAS) e pepsino solúvel (CPS) foi determinada seguindo a metodologia de Monteiro et al. (1991). As amostras obtidas foram dissolvidas em ácido acético 0,5M para a obtenção de uma solução final com concentração de 3mg/ml. A mistura foi agitada a 4°C por 24 horas, seguido por centrifugação a 5000xg durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para estudos de solubilidade descritos abaixo.

2.6.1 Efeito do pH na Solubilidade

O efeito do pH sobre a solubilidade do CAS e CPS foi avaliado segundo Monteiro et al., (1991) com modificações. As amostras obtidas (3mg/ml, 1mL) foram incubadas em soluções de água deionizada com pH ajustado pelo uso de HCl 6M ou NaOH 6M objetivando-se obter soluções com pH final variando entre 1-10, seguido de centrifugação a 20000xg durante 30 minutos a 4°C.

2.6.2 Efeito do NaCl na Solubilidade

O efeito do NaCl sobre a solubilidade do CAS e CPS foi avaliado segundo Monteiro et al., (1991). As amostras obtidas (6mg/mL, 0,5mL) foram incubados com 0,5mL de NaCl em ácido acético 0,5M em diferentes concentrações (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6% v/v), seguido de centrifugação a 20.000xg por 30 minutos a 4°C.

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos de dosagem foram realizados em triplicata e expressos em média \pm desvio padrão. As análises foram feitas utilizando o programa estatístico MicroCal[®] Origin[®] Version 8.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE COLÁGENO CAS E CPS

O rendimento total do colágeno extraído a partir da pele de corvina (*M. furnieri*) foi de 66,71% a partir do peso seco, sendo 22,46% para o CAS e 44,25% para CPS. Um resultado que mostra que o colágeno presente na pele não é totalmente solubilizado em ácido acético 0,5M. A presença de ligações covalentes cruzadas age condensando grupamentos aldeído com a lisina e hidroxiprolina nas regiões telopeptídicas causando uma redução da solubilidade do colágeno em soluções ácidas (Foegending et al., 1996; Zhang et al., 2007; Gaurav et al., 2015). Quando o resíduo da extração ácida é submetido à ação da pepsina o resultado obtido é a clivagem da região telopeptídica e a hidrólise das ligações cruzadas sem comprometer a integridade da tripla hélice (Veeruraj et al., 2015; Jia et al., 2012). As diferenças no rendimento de ASC e PSC também são afetadas por fatores como espécie de peixe utilizada como fonte, condições biológicas e métodos de extração (Gaurav et al., 2015).

Na literatura foram relatados os seguintes resultados para extração de colágeno tipo I a partir dos resíduos de processamento se baseando no peso seco: *Acipenser schrenckii* (CAS: 27,4%; CPS: 55,92%) (Liang et al., 2014); *Doryteuthis singhalensis* (CAS: 56,8%; CPS: 24,6%) (Veeruraj et al., 2015); *Acipenser schrenckii* (CAS: 37,42%; CPS: 52,8%) (Wang et al., 2014).

3.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Os padrões de colágeno CAS e CPS como mostra a figura 1 apresentaram uma distribuição de bandas similar a encontrada no colágeno bovino e demais espécies de peixes (Li et al., 2013; Bhagwat & Dandge, 2016; Sionkowska et al., 2015; Chen et al., 2016^b) indicando que o colágeno extraído da pele da corvina trata-se do tipo I. Na região entre 100 e 120 KDa evidencia-se a presença de duas bandas α (α_1 e α_2) (Foegeding et al., 1996) e na região de 200 KDa observamos as bandas β e γ . Na coluna em que ocorreu a corrida para o CAS vê-se que α_1 é proporcionalmente mais denso que α_2 e que há a presença de quantidades significativas de ligações cruzadas, fato esse evidenciado pela diferença de intensidade das bandas β de CAS e CPS respectivamente (Sato et al., 2000). Isso pode explicar a dificuldade em solubilizar o colágeno em solução ácida, sendo necessária a complementação do processo com o uso da pepsina, pois a mesma atua clivando as ligações transversais contidas nas regiões telopeptídicas das cadeias β (Miller, 1972).

3.3 ESPECTRO ULTRAVIOLETA

Na tabela 1 observamos que os colágenos CAS e CPS possuem maior taxa de absorção dos raios ultravioleta na faixa de 229 e 230 nm respectivamente, indicando que a tripla hélice de colágeno apresenta-se íntegra após o processo de extração (Kumar et al., 2012). Resultados similares são observados em *Catla catla* e *Labeo rohita* (232 nm) (Gaurav et al., 2015); *Doryteuthis singhalensis* (CAS: 230 nm; CPS: 222 nm) (Veeruraj et al., 2015); *Evenchelys macrura* (CAS: 225 nm CPS: 228 nm) (Veeruraj et al., 2013); *Mylopharyngodon piceus* (CPS: 218) (Wu et al., 2014). Na faixa do ultravioleta, proteínas absorvem luz com comprimento de onda de até 280nm, quando possuem altos níveis de tirosina, triptofano e fenilalanina, aminoácidos cromóforos sensíveis que absorvem luz ultravioleta na faixa entre 251 e 283 nm e que aparecem em pequenas quantidades no colágeno (Duan et al., 2009; Liu & Liu, 2006; Veeruraj et al., 2015; Singh et al., 2011). Os resultados indicam que o processo de extração obteve colágeno com elevado grau de pureza separando de forma eficiente proteínas não colagenosas durante o processo.

3.4 SOLUBILIDADE DO COLÁGENO

3.4.1 Efeito do pH

CAS e CPS apresentaram maior solubilidade em faixas de pH ácido, apresentando pequenas variações de solubilidade ao longo dessa faixa como mostra a figura 2. O pico de solubilidade ocorreu em pH 1,0 para os dois tipos de colágeno, havendo uma perda considerável de solubilidade a partir do pH 6,0, alcançando seu valor mínimo em pH 9,0 e 10,0 para CAS e CPS respectivamente. Diferenças na solubilidade mediante variações de pH ocorrem devido a diferentes formas de conformação do colágeno (Kittiphattanabawon et al., 2005). Outro fator é o efeito que ocorre quando o pH do meio onde está inserido o colágeno atinge um valor próximo ou igual ao ponto isoelétrico (pI), tendo como consequência a redução da solubilidade do colágeno devido ao fato de a soma das cargas positivas e negativas ser igual a zero tendo como resultado a precipitação e agregação da moléculas devido ao aumento de interações hidrofóbicas (Vojdani, 1996). Nos seguintes trabalhos podemos encontrar resultados similares *Mylopharyngodon piceus* (Wu et al., 2014), *Oreochromis niloticus* (Chen et al., 2016), *Sciaenops ocellatus* (Chen^b et al., 2016) e *Carcharhinus albimarginatus* (Jeevithan et al., 2014).

3.4.2 Efeito da Concentração de NaCl

O efeito da concentração de NaCl sobre a solubilidade de CAS e CPS pode ser observado na figura 3. Os dois tipos de colágeno apresentaram um mesmo padrão ao longo da variação da concentração de NaCl nos intervalos de 0% a 6% (p/v). A solubilidade de CAS e CPS se manteve elevada até a concentração de 2% de NaCl (p/v) apresentando uma queda expressiva a partir de 3% para ambos e se mantendo em um platô na faixa entre 4% e 6%. Devido ao efeito de “salting out”, que ocorre em concentrações elevadas de NaCl, há uma redução da solubilidade do colágeno. Os sais iônicos no meio aquoso competirão com as proteínas pelas interações com o solvente, uma vez que esses sais possuem maior força iônica a presença dos mesmos terá como efeito a redução da solubilidade do colágeno que aumentará o número de interações hidrofóbicas entre suas cadeias tendo como resultado a sua precipitação (Bae et al., 2008; Jongjareonrak et al., 2005; Di et al., 2014). Nos seguintes trabalhos foram encontrados resultados similares: *Sciaenops ocellatus* (Chen et al., 2016), *Catla catla* e *Labeo rohita*

(Gaurav et al., 2015), *Scomberomorous niphonius* (Li et al., 2013) e *Katsuwonus pelamis* (Yu et al., 2014).

3.5 ANÁLISE FTIR

Os espectros FTIR de CAS e CPS obtidos do colágeno extraído da pele de corvina são representados na figura 4 e 5. As bandas de absorção de amida apresentam-se distribuídas ao longo do espectro tanto para o CAS como para o CPS. O padrão apresentado mostra bandas típicas para o colágeno tipo I: Amida A, Amida B, Amida I, Amida II e Amida III. Normalmente associadas a vibração de estiramento de ligações N-H, que ocorre na faixa entre 3400 cm^{-1} e 3340 cm^{-1} , o pico para a Amida A ocorreu em 3298 cm^{-1} para ambos os tipos de colágeno, provavelmente devido ao envolvimento do grupo NH do peptídeo em ligações com o hidrogênio (Li et al., 2004; Pati et al., 2010). Para a Amida B o pico foi encontrado em 2923 cm^{-1} para ambos os tipos de colágeno, representando o alongamento assimétrico de CH_2 (Muyonga et al., 2004). Para a Amida I o pico máximo normalmente está localizado na faixa entre 1600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} e está associado a vibração de alongamento de grupos carbonila (C=O) ao longo do esqueleto polipeptídico, que indica a presença de estruturas secundárias (Payne & Veis, 1988). Esta Amida apresentou absorção máxima em 1627 cm^{-1} tanto para o ASC como para o PSC, resultado similar ao encontrado para *Brama australis* (Sionwkoska et al., 2015), *Cyprinus carpio* (Prashant & Dandge, 2016) e *Istiophorus platypterus* (Tamilmozhi et al., 2013). As ondas de vibração da Amida II apresentaram absorção máxima em 1547 cm^{-1} e são atribuídas a flexões no plano das ligações NH e alongamentos do CN (Zanaboni et al., 2000). O pico para a Amida III também apresentou o mesmo resultado para ambos os colágenos extraídos, 1000 cm^{-1} . Este ponto trata-se de uma complexa região em que são encontrados alongamentos de CH e NH em flexão plana a partir de ligações amida em que o colágeno sofre a interferência de interações intermoleculares bem como absorções resultantes do movimento de grupos CH_2 a partir do esqueleto de glicina e cadeias laterais de prolina (Plepis et al., 1996). Devido à similaridade apresentada na amplitude dos espectros pode-se dizer que o colágeno manteve sua integridade estrutural mediante os processos de extração. No entanto sutis diferenças podem existir entre CAS e CPS devido a ação da pepsina.

4 CONCLUSÃO

Isolar e extrair colágeno tipo I a partir da pele da corvina (*Micropogonias furnieri*) por extração ácida (CAS) e com uso de pepsina (CPS) mostrou-se possível e com um rendimento total de 66,7% sendo 22,46% de CAS e 44,25% de CPS. Os experimentos e análises realizados no presente trabalho demonstraram que o colágeno extraído trata-se do tipo I com baixos índices de contaminantes. As amostras de CAS e CPS se mostraram suscetíveis a perda de solubilidade mediante variações no pH, em direção a faixa alcalina, assim como também a aumentos nas concentrações de NaCl. O colágeno obtido a partir da pele da corvina (*M. furnieri*) tem um elevado grau de pureza, apresenta altos níveis de rendimento de extração e um grande potencial para substituir os animais terrestres como fonte alternativa de colágeno tipo I.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 817–824, 2010.

BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 234–240, 2016.

CHEN, J. et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 453–459, 2016.

Duan, R., Zhang, J. J., Du, X. Q., Yao, X. C., & Kunihiro, K. (2009). Properties of collagen E. M. Marata, & B. S. Schweigert (Eds.), *Advances in food research* (pp. 237e273). London: Academic Press.

Fernandez-Diaz, M. D., Montero, P., & Gomez-Guillen, M. C. (2001). Gel properties of collagens from skins of cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*) and their medication by coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase. **Food Chemistry**, 74, 161–167.

Foegeding, E.A., Lanier, T.C., Hultin, H.O., 1996. Characteristics of edible muscle tissues. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York, pp. 879–942.

FRUSHOUR, B. G.; KOENIG, J. L. Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. **Biopolymers**, v. 14, n. 2, p. 379–391, 1975.

HUANG, C. Y. et al. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion-hydro-extraction process. **Food Chemistry**, v. 190, p. 997–1006, 2016.

HUANG, Y. R. et al. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1507–1513, 2011.

JIA, Y. et al. Biochemical Properties of Skin Collagens Isolated from Black Carp (*Mylopharyngodon piceus*). v. 21, n. 6, p. 1585–1592, 2012.

JONGJAREONRAK, A. et al. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 475–484, 2005.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LI, Z. R. et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 1, p. 103–113, 2013.

LIANG, Q. et al. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). **Process Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 318–323, 2014.

Lin, Y. K., & Liu, D. C. (2006). Effect of pepsin digestion at different temperatures and time on properties of telopeptide-poor collagen from bird feet. *Food Chemistry*, 94, 621–625.

LIU, D. et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1441–1448, 2012.

LIU, D. et al. Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Food Bioscience**, v. 9, p. 68–74, 2015.

MARIA, A. N. A. et al. Dielectric and Pyroelectric Characterization of Anionic and Native Collagen. **2932 POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE**, v. 3, n. 24, p. 3–9, 1996.

McCormick, R. J. (2009). Collagen. In *Applied muscle biology and meat science* (pp. 127e146). Boca Raton, Florida: CRC Press.

MCCORMICK, R. J. Collagen. In *Applied muscle biology and meat science* (p. 127-146). Boca Raton, Florida: CRC Press, 2009.

Montero, P., Jimenez-Colmenero, F., & Borderias, J. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, p. 137–46, 1991.

MUYONGA, J. H, et al. Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, 85 (1), 81-89, 2004.

Pal, G. K., Nidheesh, T., & Suresh, P. V. (2015). Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*abeo rohita*). *Food Research International*, 76(Part 3), 804e812.

Pati, F., et al. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**, 101, 3737 – 3742, 2010.

PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. *Bioresource Technology* Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3737–3742, 2010.

PAYNE, K. J.; VEIS, A. Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. **Biopolymers**, v. 27, n. 11, p. 1749–1760, 1988.

Regenstein, J. M., & Zhou, P. Collagen and gelatin from marine by-product. In F. Shahidi 423 (Ed.), *Maximising the value of marine by-products* (p. 279–303). Boca Raton, Florida:424 CRC Press, 2007.

Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, H. (2011). Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124, 97e105.

SINTHUSAMRAN, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). **Food Chemistry**, v. 138, n. 4, p. 2435–2441, 2013.

TAMILMOZHI, S.; VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1499–1505, 2013.

VEERURAJ, A. et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 708e716, 2015.

VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). **Process Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 1592–1602, 2013.

Vojdani, F. (1996). Solubility. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (1st ed.). (pp. 11e60) Great Britain: St Edmundsbury Press.

Vojdani, F. Solubility. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (1st ed.). (pp. 11 - 60) Great Britain: St Edmundsbury Press. 1996.

WU, G. P. et al. Isolation and Characterization of Pepsin-Solubilized Collagen from the Skin of Black Carp (*Mylopharyngodon piceus*). n. June, p. 642–650, 2014.

ZANABONI, G. et al. Stability and networks of hydrogen bonds of the collagen triple helical structure: Influence of pH and chaotropic nature of three anions. **Matrix Biology**, v. 19, n. 6, p. 511–520, 2000.

Zeng, et al. Isolation and characterization of acid-solubilized collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v. 116, p.879-883, 2009.

ZHANG, J. et al. Isolation And Characterization Of Collagens From Scale Of Silver Carp (*Hypophthalmichthys Molitrix*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1343–1354, 2010.

Zhang, Y., et al. Isolation and partial characterisation of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 103, 906–912, 2007.

Legendas das Figuras

Figura 1: Distribuição das bandas para ASC e PSC extraídos da pele de Corvina (*M. furnieri*). Da direita para a esquerda temos as seguintes fileiras: 1° Padrão GE com proteínas de alto peso molecular; 2° Padrão ASC; 3° Padrão PSC.

Figura 2: Solubilidade do ASC e PSC em 0,5M de ácido acético submetido a variações de pH.

Figura 3: Solubilidade de ASC e PSC em 0,5M de ácido acético submetido a diferentes concentrações de NaCl.

Figura 4: Espectro FTIR para colágeno obtido a partir da pele de corvina.

Figura 5: Espectro FTIR para colágeno obtido a partir da pele de corvina.

Tabela 1: Picos de absorção de raios ultravioleta

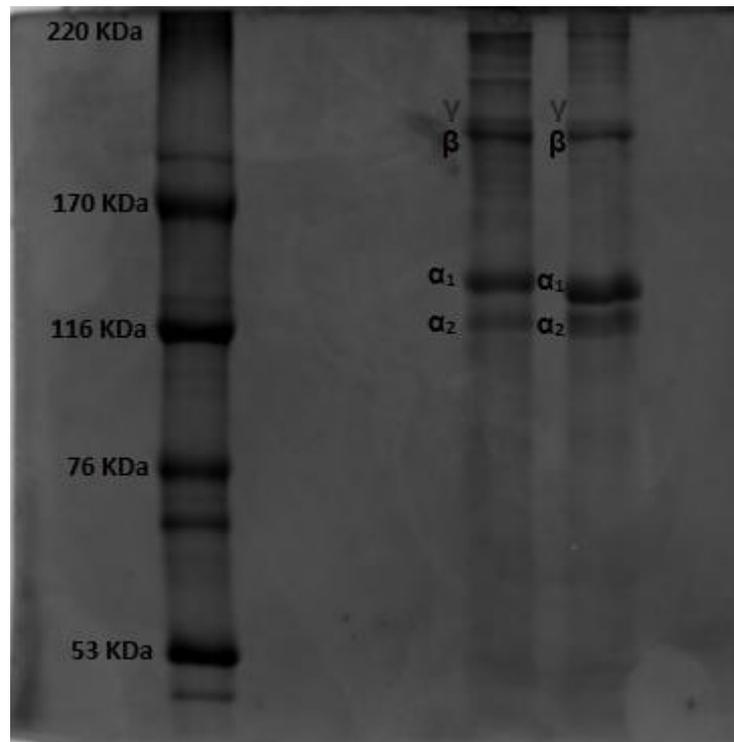


Figura 1

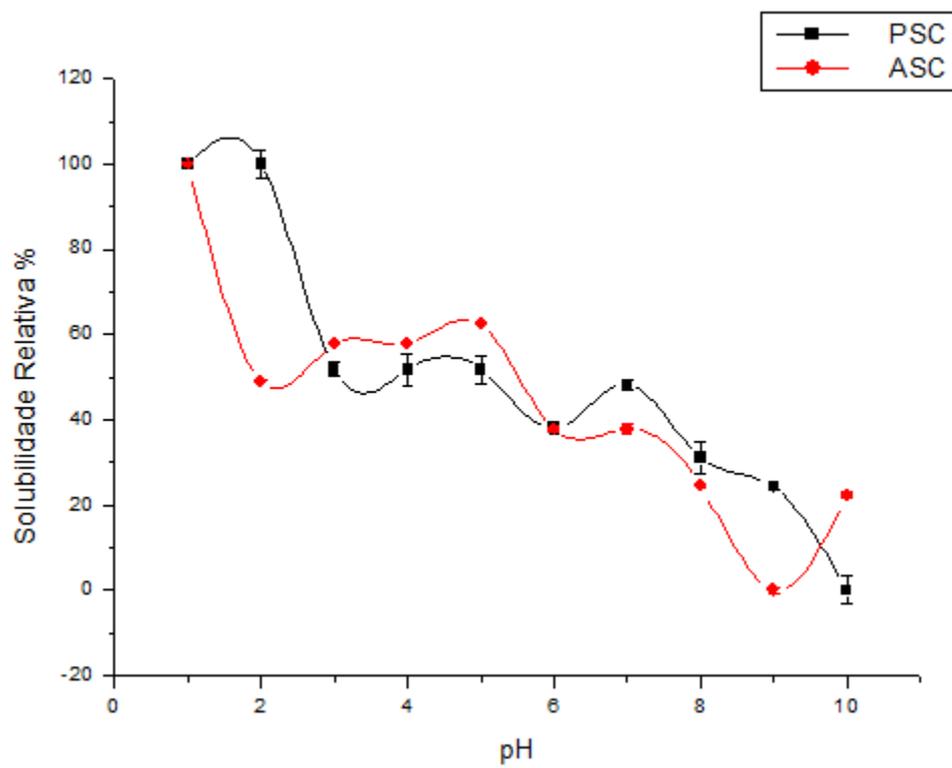


Figura 2

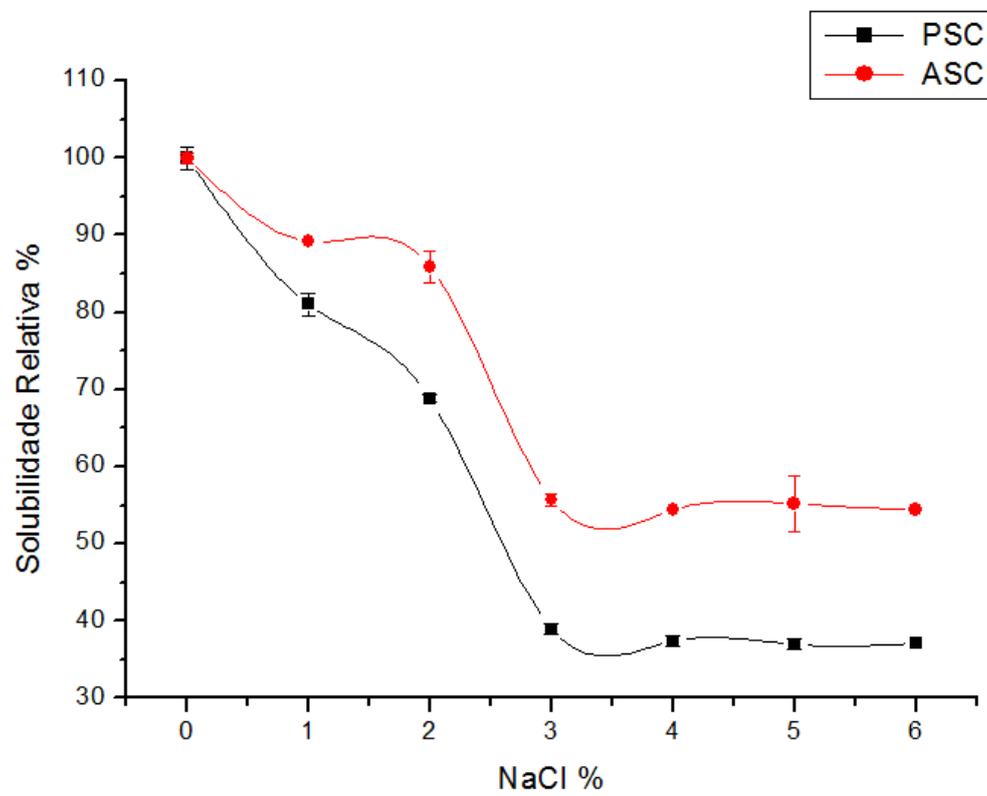


Figura 3

TIPO DE COLÁGENO/ESPÉCIE	<i>Micropogonias furnieri</i>
ASC	229nm
PSC	230nm

Tabela 1

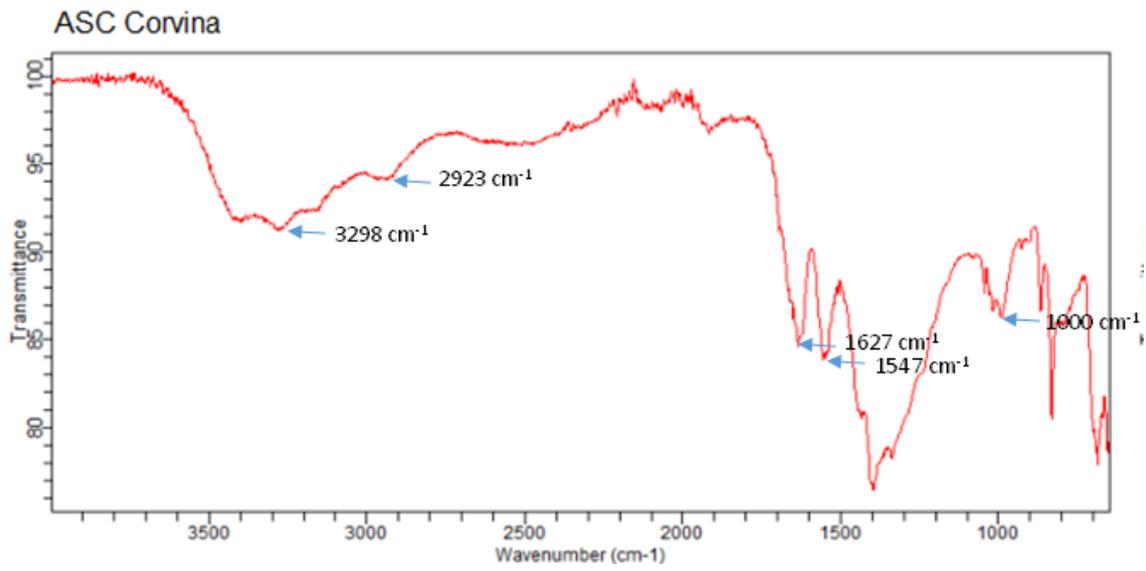


Figura 4

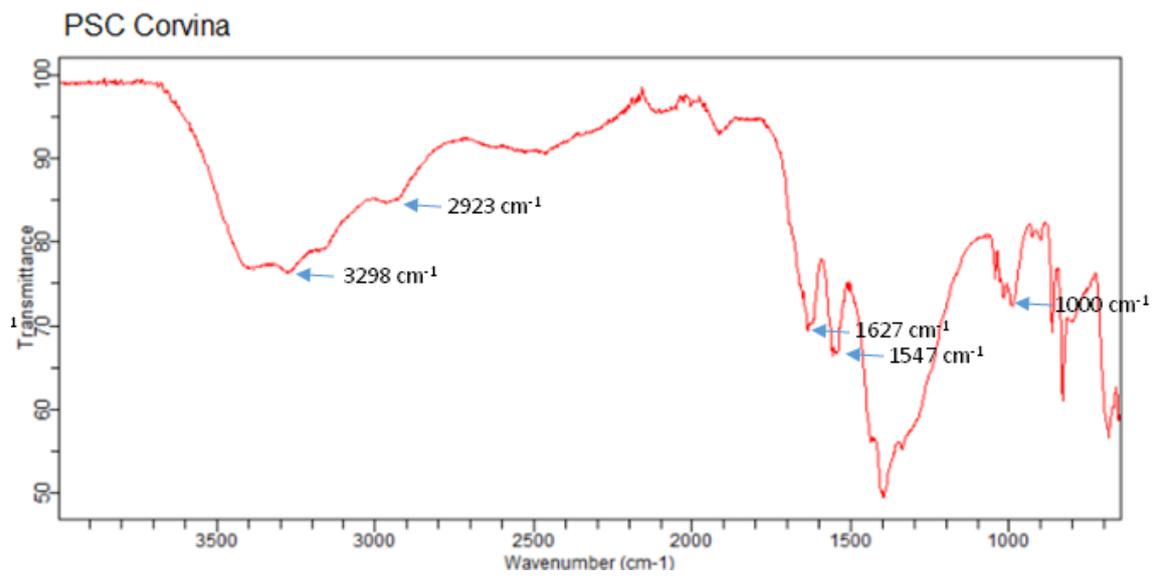


Figura 5

7 CONCLUSÃO

- A extração ácido solúvel (ASC) apresentou resultados satisfatórios tanto nos processos convencionais de precipitação como nas modificações apresentadas nos últimos trabalhos desenvolvidos neste estudo.
- O uso da pepsina para se obter colágeno pepsino solúvel (PSC) se mostrou de fundamental importância, isso porque a extração enzimática em todos os trabalhos apresentou um expressivo incremento no rendimento final da extração, como pode ser observado especialmente no trabalho desenvolvido com a corvina em que o rendimento final foi três vezes maior que o observado para a extração ácida.
- Somando-se a isso o fato de a pepsina ter realizado a extração sem comprometer a estrutura do colágeno, algo que pode ser evidenciado pelas poucas alterações provocadas na sua estrutura como pode ser constatado nas análises de SDS-PAGE e FTIR.
- Nos trabalhos envolvendo a extração de colágeno a partir das escamas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e corvina (*Micropogonias furnieri*) em que a metodologia de extração apresentou modificações, foi possível aferir que os novos métodos não comprometeram o processo, indicando que o uso do tampão Carbonato-Bicarbonato em substituição ao Tris-HCl é uma alternativa vantajosa tendo em vista o seu menor custo.
- Através das análises de absorção do espectro ultravioleta, Fourier FTIR e SDS-PAGE verificou-se que o colágeno extraído se trata do tipo I e apresenta um elevado grau de pureza, fato esse evidenciado pela baixa presença de aminoácidos cromóforos e pelo padrão de bandas apresentado em géis de SDS-PAGE.
- O colágeno obtido a partir da cioba (*Lutjanus analis*) apresentou elevada temperatura de transição, mostrando-se uma alternativa no desenvolvimento de biomateriais resistentes a grandes oscilações de temperatura.
- Em termos gerais as análises físico-químicas permitem concluir que o colágeno obtido das espécies de peixe abordadas neste estudo apresenta um perfil protéico similar ao de peixes relatados na literatura.

REFERÊNCIAS

- A. SIONKOWSKA et al. Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. **Int. J. Biol. Macromol.** 80, 605, 2015.
- ACERO, P., GARZÓN, F., J. Los pargos (Pisces: Perciformes: Lutjanidae) del Caribe Colombiano. **Actual. Bio.**, v. 14, n. 53, p. 89-99, 1985.
- AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 817–824, 2010.
- ALBUQUERQUE, C.Q. Validação, idade e crescimento larval inicial de corvina, *Micropogonias furnieri*, no estuário da Laguna dos Patos e área adjacente. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica. Fundação Universidade Federal de Rio Grande. 94 p, 2003.
- ALLEN, G. R. FAO fishes catalogue vol. 6. Snappers of the world. An annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date. **FAO Fish Synopsis**, 125, vol. 6, 208p, 1985.
- ALONSO, A. A. et al. Contributing to fisheries sustainability by making the best possible use of their resources: The BEFAIR initiative. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 11, p. 569–578, 2010.
- ARAGAO-NETO, A. C. et al. Combined therapy using low level laser and chitosan-policaaju hydrogel for wound healing. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 268–272, 2016.
- ARAÚJO-LIMA, C.A.; GOULDING, M. (1998): Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. **Sociedade Civil Mamiará**. Brasília CNPq, Tefé, Amazonas. 186p. 1998.
- BAILEY AJ, PAUL RG, KNOTT L. **Mech Ageing Dev** 106:1. 1998.
- BATISTA, V. DA S.; PETRERE JR., M. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 1, p. 53–66, 2003.
- BENETTI, D.D. Growth, survival, and feed conversion rates of hatchery-reared mutton snapper *Lutjanus analis* cultured in floating net cages. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.33, p.349-357, 2002.
- BEZERRA^a, R. D. S. et al. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 189–199, 2000.

- BEZERRA^b, R. S. et al. Partial Purification and Characterization of a Thermostable Trwsin From Pyloric Caeca of Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 2001, p. 199–210, 2001.
- BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 234–240, 2016.
- BIMBO, A. P. Current and future sources of raw materials for the long-chain omega-3 fatty acid market. **Lipid Technology**, v. 19, n. 8, p. 176–179, 2007.
- BONASSAR LJ, VACANTI CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. **J Cell Biochem.** 72(S30–S31): 297–303, 1998.
- BOTERO, J.A.; OSPINA, F.J. Crecimiento de juveniles de pargo palmero *Lutjanus analis* (Cuvier) en jaulas flotantes en Islas del Rosario, Caribe colombiano. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras**, v.31, p.205-217, 2003.
- BRUCKNER, P.; PROCKOP, D. J. Proteolytic enzymes as probes for the triple-helical conformation of procollagen. **Analytical Biochemistry**, v. 110, n. 2, p. 360–368, 1981.
- CARVALHO, R. A. DE; GROSSO, C. R. F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 495–501, 2006.
- CERVIGÓN, F. et al. Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca. Guía de campo de las especies comerciales marines y de aguas salobres de la costaseptentrional de Sur América. FAO, Roma, 1992.
- CHAGAS, E. C., et al. Tambaqui productivity reared in cages with different feeding rations. **Ciencia rural, Santa Maria**, v. 37, p. 7, 2007.
- CHEN, J. et al. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 453–459, 2016.
- CORRÊA, B. Time-space distribution of *Micropogonias furnieri* (Perciformes, sciaenidae) in a tropical estuary in southeastern Brazil. **Bol. Inst. Pesca**, v. 1, p. 1–18, 2015.
- CORTEZ-VEGA, W. R. et al. Using edible coatings from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and organo-clay nanocomposite for improve the conservation properties of fresh-cut “Formosa” papaya. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 197–202, 2014.
- COSTA, H. M. S. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DOS PEIXES BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*), PIRARUCU (*Arapaima gigas*) E XARÉU (*Caranx hippos*). **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLÓGIA-PPGBQF. UFPE**, n. 2012, p. 124, 2012.

- COSTA, S. R.; SOUZA, P. A. R. O impacto dos resíduos de pescado: o caso da “Feira do Bagaço” no município de Parintins no Amazonas. **Revista Desarrollo Local Sostenible**, v. 5, n. 14, p. 1–11, 2012.
- DA SILVA SANTOS, F. M. et al. Use of chitosan coating in increasing the shelf life of liquid smoked Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillet. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 1304–1311, 2017.
- DURHAM, E. R.; RIBEIRO, Eunice Todescan; A difusão do Adventismo da Promessa no Catulé. São Paulo: Anhembi-INEP, 1957.
- ESPÓSITO, T. S. et al. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 125–130, 2009.
- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.
- FELTES, M. M. C. et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe Alternatives for adding value for the fish processing wastes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 669–677, 2010.
- FERRARO, V. et al. Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues - A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 6, p. 3111–3120, 2013.
- FIBER, D. Unconventional Sources of Dietary Fiber. **ACS Symposium Series; American Chemical Society**, 1983.
- FIELDS GB. The collagen triple-helix: correlation of conformation with biological activities. **Connect Tissue Res**. 31(3): 235-243, 1995.
- FRÉDOU, T.; FERREIRA, B. P. Bathymetric trends of northeastern Brazilian snappers (pisces, lutjanidae): Implications for the reef fishery dynamic. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 787–800, 2005.
- FREIRE, K. M. F. et al. Brazilian recreational fisheries: current status, challenges and future direction. **Fisheries Management and Ecology**, v. 23, n. 3–4, p. 276–290, 2016.
- FREITAS, L.E.L. et al. Growth and feeding responses of the mutton snapper, *Lutjanus analis* (Cuvier 1828), fed on diets with soy protein concentrate in replacement of Anchovy fish meal. **Aquaculture Research**, v.42, p.866-877, 2011.
- FROESE, R. & D. PAULY. FishBase. World Wide Web electronic publication (Version 01/2009). Available at: www.fishbase.org. Accessed in March 2009.
- GELSE, K. et al. Collagens — Structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 55, 1531–1546, 2003.

- GOMES, E.; RONZANI, V. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesq. agropec. bras**, n. 1, p. 1673–1680, 2011.
- GOMES, L. C.; et al. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Espécies nativas para piscicultura no Brasil, v. 2, p. 175-204, 2010.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, 25(8), 1813-1827, 2011.
- GORDON, M.; Hahn, R. Collagens. **Cell Tissue Res**. 339, 247–257. 2010.
- GOULDING, M.; CARVALHO, M.L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Charachidae). An important amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.1, p.107-133, 1982.
- GUDMUNDSSON, M.; HAFSTEINSSON, H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 37–39. 1997.
- HERBAGE, D.; et al. Biochemical and physicochemical characterization of pepsin-solubilized type-II collagen from bovine articular cartilage. **Biochem J**, v. 161, n. 2, p. 303–312, 1977.
- HUANG, C. Y. et al. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion-hydro-extraction process. **Food Chemistry**, v. 190, p. 997–1006, 2016.
- HUXLEY-JONES, J. et al. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. **BMC evolutionary biology**, v. 7, p. 63, 2007.
- IKOMA, T., et al. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 32, 199–204, 2003.
- ISAAC, V. J. SYNOPSIS OF BIOLOGICAL DATA ON THE WHITEMOUTH CROAKER *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823). **Fao**, v. 70, n. 150, 1988.
- ISHIKAWA H, et al. Effects of collagen gel mixed with hydroxyapatite powder on interface between newly formed bone and grafted Achilles tendon in rabbit femoral bone tunnel. **Biomaterials**. 22:1689–94, 2001.
- J. MYLLYHARJU, K.I. KIVIRIKKO. Collagens and collagen-related diseases, **Ann. Med.** 33 7 – 21. 2001.
- JIN-WOOK WOO, et al. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsalskin. **Food Hydrocolloids**, 22 879–887, 2008.
- KIELTY, C. M.; GRANT, M. E. In *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic and Medical Aspects*; Royce, P. M., Steinmann, B., Eds.; John Wiley Inc.: New York; pp 159–221, 2002.
- KITTIPHATTANABAWON P. et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). **Food Chem** 89:363–372, 2005.

- KOKOSZKA, S. et al. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innov. Food Sci. Emer. Technol**, 11, 503, 2010.
- KOZLOWSKA, J. et al. Northern pike (*Esox lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 220–227, 2015.
- KUBITZA, F.; KUBITZA, L.M.M. Principais parasitoses e doenças de peixes cultivados. 4 ed. Jundiaí: Kubitza, F., 118p. 2004.
- KUBO, K.; TAKAGI, T. The alpha 1(I) and alpha 2(I) chains of collagen separate in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis due to differences in sodium dodecyl sulphate binding capacities. **Collagen and Related Research**, v. 4, p. 201–208, 1984.
- KUBOTA, E. H. Novos Colágenos em Peixes. São Paulo: Universidade de Ciências farmacêuticas.
- KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. **Panorama da Aquicultura**, v.14, p. 27-39, 2004.
- KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203–226, 2006.
- LI, Z. R. et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 1, p. 103–113, 2013.
- LIU W, et al. Preparation and characterization of pepsin solubilized type I collagen from the scales of snakehead (*Ophiocephalus argus*). **J Food Biochem** 33:20–37, 2009.
- LOPES, C. et al. Valorisation of fish by-products against waste management treatments - Comparison of environmental impacts. **Waste Management**, v. 46, p. 103–112, 2015.
- LYNN AK, YANNAS IV, BONFIELD W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**.71B(2):343–354, 2004.
- MACCHI, G. J.; ACHA, E. M.; MILITELLI, M. I. Seasonal egg production of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) in the Río de la Plata estuary, Argentina-Uruguay. **Fishery Bulletin**, v. 101, n. 2, p. 332–342, 2003.
- MARTONE, C. B.; BORLA, O. P.; SÁNCHEZ, J. J. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 3, p. 383–387, 2005.
- McCormick, R. J. (2009). Collagen. In *Applied muscle biology and meat science* (pp. 127e146). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- MENEZES, N.A. & FIGUEIREDO, J.L. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Teleostei. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, v.5, n. 4, p. 1-105, 1985.

- Ministério da Pesca e Aquicultura, 2015. PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA AQUICULTURA BRASILEIRA. Brasília. 61 pp.
- MONDELLO, L. et al. Rapid, micro-scale preparation and very fast gas chromatographic separation of cod liver oil fatty acid methyl esters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1566–1570, 2006.
- MPA (2015). Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010. Pp. 18-22. Brasília: Ministério da MPA. Plano De Desenvolvimento Da Aquicultura Brasileira - 2015/2020. p. 61, 2015.
- MUYONGA, J. H., et al. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 85(1), 81e89.2004.
- NA, G. C.; BUTZ, L. J.; CARROLL, R. J. Mechanism of in vitro collagen fibril assembly. Kinetic and morphological studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 26, p. 12290–12299, 1986.
- NAGAI, T., & SUZUKI, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. **Food Chemistry**, 68, 277–281.
- NAKAMURA, I. et al. **Important fishes trawled off Patagonia**. Tokyo: Japan Marine Fishery Resource Research Center.p. 72, 1986.
- OTTANI V, et al. Hierarchical structures in fibrillary collagens. *Micron Clinical consult: Marfan syndrome*. *Prim Care*. 31(3): 739-742, 2004.
- PAIVA, M. P. Recursos Pesqueiros Estuarinos e Marinheiros do Brasil. Fortaleza, UFC. 278p, 1997.
- PAL, G. K.; SURESH, P. V. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2015.
- POPPE, J. Thickening and Gelling Agents for Food; Imeson A., ed.; **Blackie Academic & Professional**: New York, 1997, chap. 7.
- PROENÇA, C.E.M; Bittencourt, P.R.L. Manual de piscicultura tropical. Brasília: IBAMA, 196p, 1994.
- RESENDE, S. M., et al. A pesca de lutjanídeos no nordeste do Brasil: Histórico das pescarias, características das espécies e relevância para o manejo. **Boletim Técnico Científico do Cepene**, 11: 257 – 270, 2003.
- ROSANGELA P. LESSA, et al. Análise Multidimensional Dos Sistemas De Produção Pesqueira Do Estado De Pernambuco, Brasil. Sistemas pesqueiros marinhos e estuarinos do Brasil, caracterização e análise da sustentabilidade. Pp. 41-55, 2011.
- SADOWSKA, M., et al. Isolation of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**, 81, 257–262, 2003.

- SANCHES, Eduardo Gomes; CERQUEIRA, Vinicius Ronzani. Preservação de sêmen refrigerado de cioba com diluentes e atmosfera modificada. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília , v. 46, n. 12, p. 1673-1680, dez. 2011 .
- SEIBEL, N. F.; SOUZA-SOARES, L. A. DE. Produção de Silagem Química com Resíduos de Pescado Marinho Production of Chemical Silage From Marine Fish Residue. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 333–337, 2003.
- SENARATNE, L. S.; PARK, P.; KIM, S. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 191–197, 2006.
- SILVA, J. F. X. et al. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 96–106, 2014.
- SILVA, J.W.B.; GURGEL, J.J.L. Situação do cultivo de *Colossoma macropomum* no âmbito do Departamento Nacional de Obras Contra Secas (DNOCS). In: Cultivo de Colossoma. In R. Hernández. Ed. Guadalupe, Bogotá, 1999.
- SKIERKA, E., AND SADOWSKA, M. “The Influence of Different Acids and Pepsin on the Extractability of Collagen from the Skin of Baltic Cod (*Gadus morhua*).” **Food Chemistry** 105: 1302–1306, 2007.
- SOUZA, M. P. et al. Development and Characterization of an Active Chitosan-Based Film Containing Quercetin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 11, p. 2183–2191, 2015.
- STARCK, W. A., II, & R. E. SCHROEDER. Investigations of the gray snapper, *Lutjanus griseus*. **Stud. Trop. Oceanogr.** (Miami) 10, 224 p, 1971.
- VEERURAJ, A. et al. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 708e716, 2015.
- Y. YAMAGUCHI, et al. Negative regulation of transforming growth factor-h by the proteoglycan decorin. **Nature** 346 281– 284.1990
- YU, D. et al. Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 9, p. 712–720, 2014.
- DA ROSA ZAVAREZE, E. et al. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P1, p. 841–848, 2014.
- ZEUGOLIS, D. I. **Collagen : Materials Analysis and Implant Uses**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2011.
- ZHANG, Z.K, et al. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagenhydrolysate derived from bovine limed split wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 90, p.23–28.2006.

ANEXO – NORMAS DA REVISTA FOOD HYDROCOLLOIDS

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS.

- **Description**
- **Audience**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**

DESCRIPTION.

Food Hydrocolloids only publishes original and novel research that is of high scientific quality. Research areas include basic and applied aspects of the characteristics, properties, functionality and use of **macromolecules in food systems. Hydrocolloids** in this context include **polysaccharides**, modified polysaccharides and **proteins** acting alone, or in mixture with other food components, as thickening agents, gelling agents, film formers or surface-active agents. Included within the scope of the journal are studies of real and model **food colloids** - dispersions, emulsions and foams – and the associated **physicochemical stability** phenomena - creaming, sedimentation, flocculation and coalescence.

In particular, *Food Hydrocolloids* covers: the full scope of **hydrocolloid behaviour**, including

isolation procedures, chemical and physicochemical characterization, through to end use and analysis in finished food products; structural characterization of established food hydrocolloids and new ones ultimately seeking food approval; **gelling mechanisms**, syneresis and polymer synergism in the gelation process; rheological investigations where these can be correlated with hydrocolloids functionality, colloid stability or **organoleptic** properties; theoretical, computational or simulation approaches to the study of **colloidal stability**, provided that they have a clear relationship to food systems; surface properties of absorbed films, and their relationship to foaming and emulsifying behaviour; phase behaviour of low-molecular-weight surfactants or soluble polymers, and their relationship to food colloid stability; droplet and bubble growth, bubble nucleation, thin-film drainage

and rupture processes; fat and water crystallization and the influence of hydrocolloids on these phenomena, with respect to stability and texture; direct applications of hydrocolloids in finished food products in all branches of the food industry, including their interactions with other food components; and toxicological, physiological and metabolic studies of hydrocolloids.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE.

Food scientists and technologists, R&D managers, concerned with the application of science in the use, development and manufacture of food hydrocolloids.

IMPACT FACTOR.

2011: 3.473 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

ABSTRACTING AND INDEXING.

AGRICOLA

BIOSIS

Biodeterioration Abstracts

Chemical Abstracts

Crop Physiology Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

Dairy Science Abstracts

EMBiology

Elsevier BIOBASE

Field Crop Abstracts

Food Science and Technology Abstracts

Foods Adlibra

Grasslands and Forage Abstracts

Horticultural Abstracts

Nutrition Abstracts

Research Alert

Review of Medical and Veterinary Mycology

Science Citation Index

Scopus

Sugar Industry Abstracts

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

P.A. Williams, Materials and Analytical Science, Glyndwr University, Plas Coch, Mold Road, Wrexham, LL11 2AW,

UK, **Email:** williamspa@glyndwr.ac.uk

Founding and Executive Editor

G.O. Phillips, Phillips Hydrocolloid Research Ltd, 2 Plymouth Drive, Radyr, Cardiff, CF15 8BL, UK, **Email:** phillipsglyn@aol.com

Associate Editors

E. Dickinson, Dept. of Food Science, University of Leeds, Woodhouse Lane, Leeds, LS2 9JT, UK, **Email:** E.Dickinson@leeds.ac.uk

E.A. Foegeding, Dept. of Food Science, College of Agriculture and Life Sciences, North Carolina State University,

Box 7624, Raleigh, NC 27695-7624, USA, **Email:** eaf@ncsu.edu

S. Kasapis, School of Applied Sciences, RMIT University, LaTrobe Street, Melbourne, VIC 3000, Australia, **Email:** stefan.kasapis@rmit.edu.au

K. Nishinari, Fac. of Human Life Sciences, Sumiyoshi, Osaka University, 558 Osaka, Japan, **Email:** nisinari@life.osaka-cu.ac.jp

Editorial Board Members

T. Bialopiotrowicz, The John Paul II Catholic University of Lublin Off-Campus Faculty of Social Sciences in

Stalowa Wola, Stalowa Wola, Poland

M. Britten, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), St.-Hyacinthe, QC, Canada

M. Corredig, University of Guelph, Guelph, ON, Canada

J. Coupland, Pennsylvania State University, Pittsburgh, PA, USA

S.W. Cui, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Guelph, ON, Canada

R. Cunha, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

L. D'Angelo, Glyndwr University, Wrexham, UK

C.G. de Kruif, NIZO Food Research, Ede, Netherlands

K.I. Draget, Norwegian Biopolymer Laboratory, Trondheim, Norway

D.E. Dunstan, University of Melbourne, Parkville, Australia

- U. Einhorn-Stoll**, Technische Universität Berlin (TUB), Berlin, Germany
- Y. Fang**, Hubei University of Technology, Wuhan, China
- S. Fiszman**, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Valencia, Spain
- T.J. Foster**, University of Nottingham, Loughborough, Leicestershire, England, UK
- T. Funami**, San-Gi Gen FFI Inc, Osaka, Japan
- L.N. Gerchenson**, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina
- H.D. Goff**, University of Guelph, Guelph, ON, Canada
- C. Gomez-Guillen**, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain
- F.M. Goycoolea**, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster, Germany
- Y. Hemar**, University of Auckland, Auckland, New Zealand
- A.A. Karim**, Industrial Technology University, Penang, Malaysia
- J.F. Kennedy**, ChembioTech Laboratories, Worcester, UK
- V. Kontogiorgos**, University of Huddersfield, Huddersfield, UK
- R.D. Ludescher**, Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA
- D.J. McClements**, University of Massachusetts, Amherst, MA, USA
- P.D. Meyer**, Sensus, Roosendaal, Netherlands
- C. Michon**, AgroParisTech, Massy Cedex, France
- E.R. Morris**, University College Cork, Cork, Ireland
- T. Nicolai**, Université du Maine, Le Mans, France
- J.M.R. Patino**, Universidad de Sevilla, Seville, Spain
- A. Pilosof**, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
- P. Rao**, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian, China
- M. Rinaudo**, CERMAV, St Martin d'Herès, France
- C. Schmitt**, Nestlé Research Center, Lausanne 26, Switzerland
- F. Sedlmeyer**, University of Applied Sciences, Mönchengladbach, Germany
- M. Semenova**, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
- S. Simsek**, North Dakota State University, Fargo, ND, USA
- H. Singh**, Massey University, Palmerston North, New Zealand
- R. Tester**, Glasgow Caledonian University, Glasgow, UK
- S. Turgeon**, Université Laval, Quebec, QC, Canada
- T. Vasiljevic**, Victoria University, Melbourne, VIC, Australia
- M. Vazquez**, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain
- P. Wilde**, Institute of Food Research, Norwich, UK

M.A.K. Williams, Massey University, Palmerston North, New Zealand

M Yadav, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Wyndmoor, PA, USA

N. Young, DuPont Nutrition and Biosciences ApS, Brabrand, Denmark

H. Zhang, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Food Hydrocolloids only publishes original and novel research that is of high scientific quality. Research areas include basic and applied aspects of the characteristics, properties, functionality and use of macromolecules in food systems. Hydrocolloids in this context include polysaccharides, modified polysaccharides and proteins acting alone, or in mixture with other food components, as thickening agents, gelling agents, film formers or surface-active agents. Included within the scope of the journal are studies of real and model food colloids - dispersions, emulsions and foams - and the associated physicochemical stability phenomena - creaming, sedimentation, flocculation and coalescence.

In particular, *Food Hydrocolloids* covers: the full scope of hydrocolloid behaviour, including isolation procedures, chemical and physicochemical characterization, through to end use and analysis in finished food products; structural characterization of established food hydrocolloids and new ones ultimately seeking food approval; gelling mechanisms, syneresis and polymer synergism in the gelation process; rheological investigations where these can be correlated with hydrocolloids functionality, colloid stability or organoleptic properties; theoretical, computational or simulation approaches to the study of colloidal stability, provided that they have a clear relationship to food systems; surface properties of absorbed films, and their relationship to foaming and emulsifying behaviour; phase behaviour of low-molecular-weight surfactants or soluble polymers, and their relationship to food colloid stability; droplet and bubble growth, bubble nucleation, thin-film drainage and rupture processes; fat and water crystallization and the influence of hydrocolloids on these phenomena, with respect to stability and texture; direct applications of hydrocolloids in finished food products in all branches of the food industry, including their interactions with other food components; and toxicological, physiological and metabolic studies of hydrocolloids.

Types of paper

Original research papers (Regular papers) Review papers Short communications Book reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review papers will be accepted in areas of topical interest and will normally focus on literature published over the previous five years.

Short Communications are concise but complete descriptions of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to literature, and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, tables and references).

Contact details for submission

Submission for all types of manuscripts to *Food Hydrocolloids* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal, <http://ees.elsevier.com/foodhyd>, you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried

out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of \$3000 applies (for further information on open access see <http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options>). Please note that you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Papers Prepared as Part of a Series

Authors are advised that closely related papers, or papers prepared as part of a series (Part I, Part II, etc.) should be submitted in strict chronological sequence, to allow for the first paper to pass through the reviewing process before the second one is considered. Papers in a series will all be handled by the same editor.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Lines must be numbered consecutively throughout the manuscript, and all pages must be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.;

in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 250 words.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online

submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text,

and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Formulae

1. Formulae should be typewritten. Leave ample space around the formulae.
2. Subscripts and superscripts should be clear.
3. Greek letters and other non-Latin or handwritten symbols should be explained where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.
4. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
5. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
6. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
7. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.
8. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.
9. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} and CO_3^{2-} , not as Ca^{++} or CO^{-3} .
10. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .
11. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Conventions

In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology

Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn). Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. For guidance in the use of biochemical terminology follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemica Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. (see the website <http://www.iupac.org/publications/compendium/index/html>) .For enzymes use the recommended name assigned by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press, New York, 1980. Where possible, use the recommended SI (Systeme International) units.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S.

Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please

provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers
- All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge)

and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are

sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.